

Departement für Pferde  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

---

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)  
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS  
Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. Katja Nuss

**Implantation von allogenen, in Albugel eingebetteten  
Bandscheiben-Chondrozyten in vorgeschädigte Nuclei pulposi -  
eine in vivo Studie an Schafen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Lena Sara Müller**

Tierärztin  
aus Zürich

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

2013



Meiner Familie



Zusammenfassung.....	1
Summary .....	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Hintergrund der Studie .....	3
1.2 Ziel der Studie .....	4
2 Literaturübersicht .....	5
2.1 Aufbau und Funktion der Bandscheibe .....	5
2.2 Bandscheibendegeneration.....	7
2.3 Regenerative Therapieverfahren .....	9
2.3.1 Metaphylaktische Therapieverfahren.....	10
2.3.2 Zellbasierte Therapieverfahren.....	11
2.3.2.1 Mesenchymale Stammzellen.....	12
2.3.2.2 Bandscheiben-Chondrozyten.....	13
2.3.3 Trägermedien .....	15
2.4 Tiermodell.....	16
2.4.1 Das Schaf als Modell für Bandscheibendegeneration .....	16
2.4.2 Modell des Bandscheibenschadens.....	17
3 Material und Methoden .....	19
3.1 Aufbau der Studie.....	19
3.2 Versuchstiere .....	20
3.3 Spendertiere.....	21
3.3.1 Operationsvorbereitung.....	21
3.3.2 Anästhesie.....	22
3.3.3 Schädigungs-Operation .....	23
3.3.4 Postoperatives Management .....	24
3.3.5 Probengewinnung .....	25

3.4	In-vitro Kultivierung der Bandscheiben-Chondrozyten .....	25
3.4.1	Herstellung von sterilem Schafserum .....	25
3.4.2	Isolation, Kultivierung und Einfrieren der Bandscheiben-Chondrozyten .....	26
3.4.3	Auftauen, Kultivierung und Präparation der Bandscheiben-Chondrozyten für die Implantation .....	28
3.5	Empfängertiere .....	29
3.5.1	Operationsvorbereitung, Anästhesie und postoperatives Management.....	29
3.5.2	Schädigungs-Operation.....	29
3.5.3	Implantations-Operation.....	29
3.6	Probengewinnung und -aufbereitung.....	31
3.6.1	Magnetresonanztomographische Untersuchung .....	31
3.6.2	Herstellung der histologischen Schnitte .....	32
3.6.3	Herstellung der immunhistochemischen Schnitte .....	33
3.6.4	Aufbereitung des Gewebes für die Untersuchung der Genexpression und der biochemischen Parameter .....	34
3.6.5	Biochemische Untersuchungen .....	34
3.6.5.1	Bestimmung des DNA-Gehaltes .....	35
3.6.5.2	Bestimmung des Kollagengehaltes.....	35
3.6.5.3	Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes.....	36
3.6.6	Genexpressionsanalyse.....	36
3.7	Auswertung.....	37
3.7.1	Makroskopische Aufnahmen .....	37
3.7.2	Magnetresonanztomographische Aufnahmen .....	37
3.7.3	Histologische Schnitte.....	38
3.7.4	Immunhistochemische Schnitte .....	40
3.7.5	Biochemische Auswertung .....	40
3.7.6	Auswertung der Genexpressionsanalyse .....	40

3.8	Statistik .....	40
<hr/>		
4	Resultate .....	41
4.1	Versuchstiere .....	41
4.2	Operationstechnik.....	42
4.3	Probengewinnung und -aufbereitung .....	42
4.4	Makroskopische Auswertung.....	43
4.5	Magnetresonanztomographische Auswertung.....	44
4.5.1	Pfirrmann-Grading.....	44
4.5.2	Absolute Bandscheibenhöhe .....	45
4.5.3	Winkel angrenzende Wirbelkörper.....	45
4.6	Histologische Auswertung.....	46
4.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	46
4.6.1.1	Zelldichte.....	46
4.6.1.2	Chondrozytencluster.....	47
4.6.2	Alcianblau-Periodic-Acid-Schiffs-Färbung.....	47
4.6.3	Pikrosiriusrot-Färbung.....	48
4.7	Immunhistochemische Auswertung.....	48
4.7.1	Aggrecan .....	48
4.7.2	Kollagen I .....	49
4.7.3	Kollagen II.....	49
4.8	Biochemische Auswertung.....	49
4.8.1	Kollagengehalt.....	49
4.8.2	DNA-Gehalt.....	50
4.8.3	Glykosaminoglykangehalt.....	50
4.9	Genexpression .....	51
4.9.1	Kollagen I A2 .....	51
4.9.2	Kollagen II A1.....	51
4.9.3	Kollagen X.....	51

4.9.4	Aggrecan.....	52
4.9.5	Hyaluronansynthase 2 und 3.....	52
4.9.6	Alkalische Phosphatase .....	52
4.9.7	Lubricin.....	53
4.9.8	Interleukin-1 .....	53
<hr/>		
5	Diskussion .....	54
6	Literaturverzeichnis .....	70
7	Abkürzungsverzeichnis.....	79
8	Anhang.....	80
8.1	Diagramme .....	80
8.2	Tabellen.....	96
8.3	Abbildungen .....	99
<hr/>		
9	Danksagung .....	1



## Zusammenfassung

*Albugel* ist ein neuartiges, in-situ polymerisierendes Zwei-Komponenten-Hydrogel für die Anwendung in der regenerativen Medizin.

In der vorliegenden Studie sollte die Wirkung von in *Albugel* eingebetteten Bandscheiben-Chondrozyten auf die Regeneration von vorgeschädigten Bandscheiben im Tiermodell untersucht werden.

Dafür wurden vorgeschädigte Bandscheiben von 18 Schafen mit in vitro expandierten und in *Albugel* eingebetteten Zellen aus vorgeschädigten Bandscheiben von Spendertieren behandelt. Als Kontrollen dienten Bandscheiben, die nicht oder nur mit *Albugel* behandelt wurden sowie intakte Nachbarbandscheiben. Je 6 Schafe wurden 7, 11 und 15 Wochen nach der Schädigungsoperation geschlachtet und ihre Bandscheiben makroskopisch, histologisch, immunhistochemisch, biochemisch, mittels MRI und PCR auf bandscheibentypische Merkmale und Anzeichen von Degeneration untersucht.

Die erhobenen Daten zeigten grosse individuelle Unterschiede und unerwartet frühe Degeneration in allen untersuchten Bandscheiben, auch in den intakten.

Die breiten Streuung der Ergebnisse, das Fehlen von statistischer Signifikanz sowie die mangelnde Kenntnis der präoperativen Ausgangslage als Vergleich erschweren eine Aussage über die Wirkung dieser Therapiemethode.

Da die behandelten Bandscheiben keine Anzeichen von Fremdkörperreaktionen aufwiesen, konnte hingegen aufgezeigt werden, dass die Anwendung von *Albugel* mit oder ohne Zellen keine Sicherheitsrisiken in sich trägt.

### Summary

*Albugel* is a new two-component hydrogel for regenerative medicine that polymerizes in-situ. In this study we investigated the effect of chondrocyte-like disc cells embedded in *Albugel* on pre-damaged lumbar intervertebral discs (IVDs) in an animal model.

Predamaged IVDs of 18 sheep were treated with chondrocyte-like disc cells embedded in *Albugel*. These cells were extracted from predamaged IVDs of donor sheep and then expanded in vitro. Non-treated IVDs, only with *Albugel* treated IVDs and undamaged adjacent IVDs served as control. Seven, 11 and 15 weeks after disc damage surgery each time six sheep were sacrificed and their IVDs were examined for disc-specific markers and signs of degeneration using MRI, PCR, macroscopical, histological, immunohistochemical and biochemical methods.

The collected data showed large individual differences between the animals and unexpected early signs of degeneration in all examined lumbar intervertebral discs, even in the undamaged ones.

This large variance of the results, the missing statistical significance and the fact, that we did not have knowledge of the pre-surgical situation for comparison make it difficult to give a scientific statement about the curative effect of the tested treatment.

As the treated intervertebral discs did not show any foreign body reactions we could show that the application of *Albugel* with or without disc cells does not involve safety risks.

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund der Studie

Rückenschmerzen gehören zu den am häufigsten vorkommenden Leiden in der westlichen Gesellschaft. Darunter leiden nicht nur die betroffenen Personen, auch der wirtschaftliche Schaden durch krankheitsbedingte Ausfälle am Arbeitsplatz und Kosten im Gesundheitswesen ist enorm. Laut einer Studie der Schweizerischen Unfallversicherung (Suva) belaufen sich die durch Rücken- und Nackenschmerzen verursachten Kosten für die Schweizer Volkswirtschaft jährlich auf etwa 2.5 bis 3 Milliarden Franken.

Nicht selten spielen Degenerationsprozesse in der Bandscheibe eine Rolle im Ursachenkomplex dieser Schmerzen. Heutige Therapien bei klinisch manifesten Bandscheibenprotrusionen oder -prolapsen sind primär symptomatisch und sollen zu einer Reduktion der Schmerzen sowie einer möglichst weitgehenden Wiederherstellung von Beweglichkeit und Arbeitsfähigkeit führen. Durch konservative Methoden soll der Schmerz gemindert werden, wenn nötig werden chirurgische Massnahmen ergriffen. Von einer Heilung im eigentlichen Sinn kann auch bei Verbesserung der Symptome aber nicht gesprochen werden, da trotz dieser therapeutischen Massnahmen die Degeneration in der betroffenen und, durch die veränderte segmentale Biomechanik, auch in den angrenzenden Bandscheiben fortschreitet. Die Re-Operationsrate in den Jahren nach einem chirurgischen Bandscheibeneingriff ist dementsprechend hoch.

Lange galten Bandscheiben als nicht-regenerierbares Gewebe, da sie im Erwachsenenalter vollständig von der Blutzufuhr abgeschnitten sind und nur durch Diffusion ernährt werden. Neue Konzepte aus der regenerativen Medizin haben zum Ziel, trotz dieser schwierigen Ernährungssituation eine Heilung von geschädigtem Bandscheibengewebe zu erreichen. Damit soll es in Zukunft möglich sein, bandscheibenbedingte Rückenschmerzen nicht nur

symptomatisch und vorübergehend zu bekämpfen, sondern ihre Ursache dauerhaft zu eliminieren.

Ein vielversprechender Ansatz scheint die Anwendung von in spezielle Hydrogele eingebetteten autologen Zellen in die betroffene Bandscheibe zu sein. Das in dieser Studie untersuchte *Albugel* ist ein neuartiges, in situ polymerisierendes Zwei-Komponenten-Hydrogel, bestehend aus einer Grundsubstanz auf Basis von Hyaluronsäure und Maleimidoalbumin und einer Polyethylenglycol-Vernetzerflüssigkeit.

### 1.2 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, neben der Verträglichkeit die Wirkung von in *Albugel* eingebetteten Bandscheiben-Chondrozyten auf die Regeneration von vorgeschädigten Bandscheiben im Tiermodell zu prüfen.

Dafür wurden vorgeschädigte Bandscheiben von 18 Schafen mit *Albugel* behandelt. In jeweils eine Bandscheibe wurde nur das Hydrogel injiziert. Eine zweite Bandscheibe wurde mit *Albugel* therapiert, in welches Bandscheiben-Chondrozyten von einem Spendertier eingebettet waren. Zum Vergleich wurden *intakte* Nachbarbandscheiben herangezogen, als Negativkontrolle dienten *geschädigte, unbehandelte* Bandscheiben.

Nach der Schlachtung der Tiere wurden die Bandscheiben auf typische Gewebsmerkmale und Anzeichen von Degeneration untersucht.

Im Jahre 2011 wurden, in einer ähnlich angelegten Studie, die mit *Albugel* behandelte Bandscheiben 6 Monate nach der Schädigung untersucht. Im vorliegenden Versuch sollten die Tiere bereits nach 7, 11 oder 15 Wochen geschlachtet werden, um Informationen über früher ablaufende Prozesse zu gewinnen.

Bei einer späteren Anwendung am Menschen soll das in der Prolapschirurgie entnommene vorgefallene Bandscheibengewebe im Zellkulturlabor kultiviert werden. Sobald der Anulus fibrosus verheilt ist, etwa drei Monate nach der Operation, sollen diese autologen Zellen in *Albugel* eingebettet und reimplantiert werden und dadurch eine Wiederherstellung der physiologischen Bandscheibenfunktion unterstützen.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Aufbau und Funktion der Bandscheibe**

Die Bandscheibe liegt jeweils zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wirbelkörpern und verbindet diese als eine Art Stossdämpfer. Sie zeichnet sich aus durch ihren komplexen Aufbau aus einer äusseren Ringstruktur aus Faserknorpel (Anulus fibrosus) und einem gallertigen Kern (Nucleus pulposus). Den Übergang zwischen der Bandscheibe und den knöchernen Wirbelkörpern bildet die Endplatte aus hyalinem Knorpel [1].

Der Anulus fibrosus besteht aus Lamellen fester, zwiebelschalenartig angeordneter Kollagenfasern. Diese werden hauptsächlich aus Kollagen Typ I gebildet, während im Nucleus Kollagen Typ II vorherrschend ist. Zwischen diesen Lamellen liegen, vor allem in der äusseren Anulusregion, längliche, fibroblastenähnliche Zellen. In dieser Region findet sich auch das Glykoprotein Lubricin. Es wird vermutet, dass es von den Fibrochondrozyten im Anulus synthetisiert wird, um eine Adhäsion zwischen den Kollagenlamellen zu verhindern [2].

Im Zentrum der Bandscheibe befindet sich der Nucleus pulposus, bestehend aus einem zellulären Anteil und der extrazellulären Matrix, einer gallertartigen, homogenen Masse mit 70-90% Wasseranteil. Dieser hohe Wassergehalt wird durch die hohe Konzentration an osmotisch aktiven Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix ermöglicht, welche von den Bandscheiben-

Chondrozyten gebildet werden. Das für die osmotische Aktivität hauptverantwortliche Proteoglykan in der Bandscheibe ist Aggrecan. Ein Aggrecan-Monomer besteht aus einem langen Kernprotein, an dem die Glykosaminoglykane Chondroitinsulfat und Keratansulfat als Seitenketten ansetzen. Vernetzt durch Hyaluronsäure, bilden die Monomere grossräumige Aggregate [3]. Für eine hohe osmotische Aktivität müssen die Glykosaminoglykan-Seitenketten der Proteoglykane möglichst lang, negativ geladen und somit sauer sein [4]. Auch die Hyaluronsäure bietet Bindungsstellen für grosse molare Mengen Wasser [5]. Massgeblich an der Hyaluronsäureproduktion in den Chondrozyten beteiligt sind die Hyaluronansynthase Isoenzyme 2 und 3 [6]. Hyaluronansynthase kann deswegen auch als Indikator für die Funktionsfähigkeit der Bandscheiben-Chondrozyten angesehen werden [7].

Mechanisch erfüllt die Bandscheibe die Funktion eines druckelastischen, hydrostatischen Systems, bestehend aus druckfestem Kern und zugfester Hülle. Dieses System bewirkt, dass der bei Belastung der Wirbelsäule entstehende hydrostatische Druck vom Nucleus auf den Anulus und die angrenzenden Endplatten übertragen wird. Dies ermöglicht eine gleichmässige Verteilung der Kräfte über den gesamten Wirbelquerschnitt [8].

Im Erwachsenenalter ist die Bandscheibe nicht mehr vaskularisiert. Sie ist durch die knorpelige Endplatte und den subchondralen Knochen von der Blutzufuhr abgeschlossen, die Ernährung erfolgt durch Diffusion [9, 10]. Die Zellen in der Bandscheibe sind dadurch einem besonderen Umfeld mit tiefem pH-Wert und niedrigen Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen ausgesetzt [11]. Diese Bedingungen limitieren die intrinsische Regenerationskapazität der Bandscheibe und machen die Entwicklung regenerativer Therapieansätze zu einer anspruchsvollen Aufgabe [12].

## **2.2 Bandscheibendegeneration**

Die genauen Ursachen und Abläufe der Bandscheibendegeneration sind noch nicht geklärt. Auch ist eine exakte Abgrenzung physiologischer Alterungsvorgänge von als pathologisch anzusehenden Degenerationsprozessen schwierig [1, 13].

Man geht davon aus, dass die degenerativen Prozesse in der Bandscheibe beim Menschen bereits im frühen Erwachsenenalter ihren Lauf nehmen [14]. Nach Abschluss der Skelettreife sind die Bandscheiben durch die Endplatten vollständig von der ossären Blutversorgung abgeschnitten und die Versorgung ihrer Zellen muss allein durch Diffusion erfolgen. Man nimmt an, dass unter anderem diese besondere Ernährungssituation als Trigger für den Degenerationsprozess fungiert. Mit dem Körperwachstum und somit dem Wachstum der Bandscheiben und der dicker werdenden Endplatten steigt das Risiko einer Mangelversorgung, da damit auch die Diffusionswege für den Zu- und Abtransport von Nährstoffen und schädlichen Zellmetaboliten länger werden [1, 11]. Auch andere Faktoren, welche die Blutzufuhr zu den Wirbelkörpern beeinträchtigen, wie zum Beispiel Arteriosklerose, können Degenerationsprozesse in der Bandscheibe begünstigen [15, 16]. Des Weiteren geht man davon aus, dass übermäßige mechanische Belastung einen negativen Einfluss auf die Bandscheiben hat und dass auch genetische Prädispositionen bei der Degeneration eine Rolle spielen [13].

Im Zuge der Bandscheibendegeneration transformiert sich die Struktur des Nucleus pulposus aufgrund von Veränderungen auf molekularer Ebene vom stark wasserhaltigen Gel zu einem ausgetrockneten Gewebe. Im festen, vielschichtigen Anulus fibrosus bilden sich im inneren Bereich Fissuren, die sich im Verlaufe des Degenerationsprozesses radiär nach Aussen ausdehnen [17]. Begünstigt durch die reduzierte Elastizität des Gewebes sind Protrusion, Prolaps oder Sequestration mögliche Konsequenzen, welche zu Schmerzen, aber auch zu sensiblen oder motorischen Ausfällen führen können.

Im histologischen Bild zeigen sich vermehrt Proliferate von Bandscheiben-Chondrozyten, sogenannte Cluster, der Verlust der typischen Kollagenstruktur hin zu einem aufgelockerten, unorganisierten Gewebe sowie granuläre und muköse Degeneration [1, 13, 18]. Solche granulären Veränderungen zeigen sich als eosinophile, körnige, in sich amorphe Strukturen in der Matrix [1]. Die Bildung von Zellclustern wird von einigen Autoren als primär degenerativer Prozess [19], von anderen als eine anabole Stressantwort auf veränderte Umweltbedingungen angesehen [20, 21]. Diese zelluläre Reaktion ist mit erhöhten Konzentrationen von Stressproteinen [20] und erhöhter Zellproliferation [21] verbunden. Was die Zelldichte im degenerativen Nucleus pulposus angeht, sind unterschiedliche Angaben zu finden. Meist wird von einer Abnahme im Laufe des Degenerationsprozesses gesprochen, in einigen Studien konnte jedoch sogar eine Erhöhung der Zelldichte bei fortgeschrittener Degeneration gezeigt werden [21-23]. Es wird deswegen angenommen, dass nicht primär die Zahl, sondern vielmehr die Funktionsfähigkeit der Bandscheibenzellen entscheidend ist [24].

Zellalterung und die damit einhergehende verminderte Bildung von knorpelspezifischer extrazellulärer Matrix wie Kollagen II oder Proteoglykanen, insbesondere Aggrecan, ist eines der Hauptmerkmale der Bandscheibendegeneration [25, 26]. Während im inneren Teil einer gesunden Bandscheibe Kollagen Typ II den grössten Anteil am Gesamtkollagen ausmacht, wird dieses im Verlauf der Degeneration stark herunterreguliert. Stattdessen wird vermehrt Kollagen Typ I gebildet, welches in diesen Regionen normalerweise kaum vorkommt [27, 28].

Im fortgeschrittenen Degenerationsstadium kommt es ausserdem zur Bildung hyperthropher Chondrozyten. Im Umkreis dieser Zellen zeigt sich eine veränderte extrazelluläre Matrix. So wird unter anderem Kollagen X gebildet, welches als Marker für hypertrophe, nicht mehr vollständig funktionsfähige



Chondrozyten gilt und in gesunden adulten Bandscheiben kaum vorkommt [26, 29, 30].

Die Zellen degenerierter Bandscheiben produzieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, sowie katabole Enzyme, zum Beispiel Matrix-Metalloproteinasen [31-34]. Eine gesteigerte alkalische Phosphatase-Aktivität in Bandscheiben mit weit fortgeschrittener Degeneration zeigt deren erhöhtes Kalzifizierungspotential [26, 35].

Dieser strukturelle Wandel und die Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beeinträchtigen die ursprüngliche biomechanische Funktion der Bandscheibe, die Umverteilung der Kräfte kann nicht mehr optimal erfolgen [17].

### **2.3 Regenerative Therapieverfahren**

Aktuelle Therapien bei degenerativen Bandscheibenproblemen sind primär symptomatisch und sollen zu einer Reduktion der Schmerzen sowie einer möglichst weitgehenden Wiederherstellung von Beweglichkeit und Arbeitsfähigkeit führen. Die Patienten werden zumeist konservativ behandelt, primär mit systemischer oder lokaler Schmerzbehandlung oder physiotherapeutischen Massnahmen [13]. Wird ein chirurgischer Eingriff durchgeführt, zielt dieser bei den etablierten Verfahren der partiellen oder totalen Diskektomie darauf ab, Rückenmark oder Nervenwurzeln vom Druck des vorgewölbten oder vorgefallenen Bandscheibengewebes zu befreien. Zur Stabilisierung des Bewegungssegments werden die Wirbel oftmals zusätzlich instrumentell fixiert. Durch das verlorene Bandscheibenmaterial entsteht ein Höhenverlust im Bandscheibenraum [36]. Dieser führt zu einer unphysiologischen Belastung der kleinen Wirbelgelenke und verändert, verstärkt noch durch chirurgische Fixationsmassnahmen, die segmentale

Biomechanik, wodurch sich wiederum das Risiko für degenerative Prozesse in den angrenzenden Bandscheiben und Wirbeln langfristig erhöht [37-39].

Die neuartigen regenerativen oder biologischen Therapieverfahren verfolgen im Gegensatz zu den etablierten Methoden das Ziel, die Bandscheibe in ihrer Struktur und Funktion zu erhalten bzw. wiederherzustellen. Hierbei können zwei Ansätze unterschieden werden: Einige Behandlungsverfahren haben metaphylaktischen Charakter und sollen zu einer Verlangsamung der degenerativen Prozesse führen, sodass ein chirurgischer Eingriff nicht mehr nötig wird oder zumindest hinausgezögert werden kann. Andere Verfahren stellen den Wiederaufbau des Bandscheibengewebes bei stark fortgeschrittener Degeneration und nach partiellen oder totalen Diskektomien in den Vordergrund. Das Ziel ist dabei, die Stossdämpferfunktion der Bandscheibe wiederherzustellen und deren ursprüngliche Höhe zu erhalten, um die kleinen Wirbelgelenke und die angrenzenden Bandscheibensegmente zu schonen. Diese neuen Therapiemethoden wurden bisher vor allem in vitro und in Studien mit kleinen Versuchstieren wie Ratten oder Kaninchen getestet [40-44].

### **2.3.1 Metaphylaktische Therapieverfahren**

Der metaphylaktische Ansatz soll vor allem im Frühstadium der Bandscheibendegeneration erfolgreich angewendet werden können. Die noch reichlich vorhandenen, weitgehend funktionstüchtigen Bandscheiben-Chondrozyten sollen mittels Injektion von Wachstumsfaktoren zu vermehrter Matrixproduktion stimuliert werden [45]. Wachstumsfaktoren können in Reinform [46, 47] oder als Bestandteil von thrombozytenreichem Plasma (PRP) [48, 49] appliziert werden. In vitro wird gegenwärtig auch die Injektion von Antagonisten inflammatorischer Zytokine zum Schutz der Bandscheibenzellen vor degenerativen Prozessen untersucht [50, 51]. Es wird jedoch angenommen, dass der Erfolg dieser Injektionen beschränkt sein wird, da die Substanzen

innerhalb der Bandscheibe nur eine kurze Zeit aktiv sind. Um eine langfristige Wirkung dieser Stoffe zu erreichen, wird versucht, entsprechendes genomisches Material in die Zellen der Bandscheibe zu transduzieren. Dank dieser neuen genetischen Information sollen dann die gewünschten Wachstumsfaktoren oder Zytokinantagonisten fortwährend produziert und somit hohe Konzentrationen der therapeutischen Substanzen über längere Zeit aufrechterhalten werden [13, 52, 53]. Als Vektoren für die Transduktion eignen sich unter anderem adeno-assoziierte Viren [52, 54, 55].

Sind die Bandscheiben bereits stark degeneriert, eignen sich diese metaphylaktischen Behandlungsmethoden nicht, da nicht mehr genügend Bandscheiben-Chondrozyten vorhanden sind, welche auf eine Stimulation antworten können [45].

Der zweite Ansatz basiert auf der Injektion von Nucleus-Ersatzmaterial in die Bandscheibe und kann auch bei fortgeschrittener Degeneration oder nach einer Diskektomie noch angewendet werden. Dabei kommen oft Hydrogele zum Einsatz. Sie zeichnen sich durch ihr hohes Wasserbindungsvermögen und ihre gute Biokompatibilität aus [56].

Hydrogele können als alleiniges Füllmaterial verwendet werden, welches neben der rein mechanischen Funktion zusätzlich auch reparationsfördernde Eigenschaften haben kann, oder sie dienen als Trägermedium für Zellen oder andere therapeutische Substanzen [57-59].

### **2.3.2 Zellbasierte Therapieverfahren**

Bei den zellbasierten Therapieverfahren soll die Population der Bandscheiben-Chondrozyten vergrößert, regeneriert oder ersetzt werden. Diese implantierten Zellen sollen dann die bandscheibentypische extrazelluläre Matrix produzieren,

wodurch der Wassergehalt wieder steigt und die normale segmentale biomechanische Funktion wiederhergestellt wird [25].

Zellen, die zum Wiederaufbau der Bandscheiben eingesetzt werden, müssen Proteoglykane, Kollagen Typ II und andere Matrix-Proteine in grossen Mengen produzieren können [60]. Für den Einsatz in der regenerativen Bandscheibentherapie eignen sich unter anderem mesenchymale Stammzellen[61] und Bandscheiben-Chondrozyten [62].

### *2.3.2.1 Mesenchymale Stammzellen*

Mesenchymale Stammzellen (MSC) werden in anderen Bereichen der regenerativen Medizin bereits in klinischen Studien erprobt, so zum Beispiel zur Therapie von Knochen- [63] und Knorpeldefekten [64].

Der Grund für ihre vielseitige Einsetzbarkeit ist, dass sie, je nach Umgebung und biologischen Signalen, zu den unterschiedlichsten Zellen ausdifferenzieren können. Ein weiterer Vorteil von mesenchymalen Stammzellen liegt in ihrer leichten Zugänglichkeit. Sie können zum Beispiel aus Knochenmark [65], Fettgewebe [66, 67] oder Synovialflüssigkeit [68] gewonnen werden.

In vitro wurde gezeigt, dass MSC zusammen mit entsprechenden Wachstumsfaktoren, in einem hypoxischen Umfeld zu chondrozytenartigen Zellen differenzieren können [69].

Die Überlebenschancen mesenchymaler Stammzellen innerhalb der Bandscheibe werden widersprüchlich beurteilt. Eine in-vivo Studie mit Miniaturschweinen zeigte, dass die MSC nicht fähig waren, in der avaskulären Umgebung der Bandscheibe zu überleben [70]. In einer anderen Studie mit Kaninchen hingegen überlebten in Kochsalzlösung suspendierte, allogene Stammzellen innerhalb der Bandscheibe bis zu 24 Wochen nach der Injektion [71]. Die Überlebenschancen der Zellen können durch adäquate Trägermedien erhöht werden [18, 72, 73].

In einer klinischen Pilotstudie wurden zehn Patienten mit chronischen Rückenschmerzen mit MSC-Injektionen in die betroffenen Bandscheiben behandelt. Nach einem Jahr zeigten sich bessere Ergebnisse bezüglich Lebensqualität und Schmerzlinderung als in vergleichbaren Studien mit etablierten Behandlungsmethoden. Die ursprüngliche Höhe der Bandscheibe konnte nicht wiederhergestellt werden, jedoch hatte sich der Wassergehalt signifikant erhöht [74].

#### *2.3.2.2 Bandscheiben-Chondrozyten*

Eine weitere mögliche Zellart für den Einsatz in der regenerativen Therapie sind Chondrozyten aus dem Zentrum der Bandscheibe, das heisst, aus der Region, wo die benötigte extrazelluläre Matrix natürlicherweise gebildet wird. Diese Zellen sind normalerweise nur schwer zugänglich. Wird jedoch ohnehin eine Prolapsoperation durchgeführt und dabei Bandscheibengewebe entnommen, so können daraus gewonnene Zellen in-vitro angezüchtet und später minimalinvasiv wieder implantiert werden. Es ist in diesem Falle also kein zusätzlicher Eingriff zur Gewinnung der Zellen notwendig [36].

Die beiden Gewebearten der Bandscheibe, der Anulus, welcher vorwiegend Fibrochondrozyten und Fibroblasten enthält, und der Nucleus mit den chondrozytenartigen Zellen, sind nach der Prolapsentnahme kaum voneinander zu trennen. Es ist zu klären, ob eine Mischung der beiden Zelltypen den Wiederaufbau der Bandscheibe induzieren kann [62, 75]. In-vitro ist bewiesen worden, dass sowohl Nucleuszellen als auch Zellen, die aus dem inneren oder äusseren Anulus gewonnen wurden, fähig sind, grosse Mengen an Kollagen Typ II und Glykosaminoglykanen zu produzieren. Dafür benötigen sie eine adäquate Umgebung, in jener Studie wurden sie in ein Alginat-Hydrogel eingebettet [75].

Das bei einer Prolapsoperation gewonnene Bandscheibenmaterial ist bereits beschädigt und unter Umständen sind auch die darin vorhandenen Zellen in ihrer Funktion eingeschränkt. Sie können Anzeichen einer Entdifferenzierung und Degeneration zeigen, was sich bei der in-vitro-Kultivierung noch weiter verstärken kann. Dies gilt besonders für eine partielle Entnahme von ausschliesslich Prolapsgewebe, bei einer totalen Diskektomie sind mehr funktionsfähige Zellen zu erwarten [76]. Andere Untersuchungen zeigen wiederum, dass bei Prolapsoperationen entnommene Zellen durchaus volle Differenzierung und Bildung chondrozytentypischer Matrix aufweisen können [7].

Ein weiterer kritischer Punkt bei diesem Therapieansatz ist, dass eine allfällige genetische Prädisposition der Zellen für Degeneration auch bei einer Reimplantation erhalten bleibt [77].

Was das Überleben der ausgereiften Chondrozyten in der Bandscheibe angeht, schneiden sie in Grosstierversuchen besser ab als mesenchymale Stammzellen [70]. Auch bezüglich der Produktion von Matrixproteinen in-vitro scheinen die ausgereiften Bandscheibenzellen den mesenchymalen Stammzellen überlegen zu sein [18].

Die Transplantation von autologen Bandscheiben-Chondrozyten (ADCI) findet seit 2002 in einer grossangelegten Multicenter-Studie europaweit Anwendung in der Humanmedizin. Ein erster Zwischenbericht dieser sogenannten EuroDisc-Studie, basierend auf Daten von 28 Patienten, zwei Jahre nach der Reimplantation von Bandscheibenzellen, zeigt ermutigende Ergebnisse. Die mit ADCI behandelten Personen haben bessere klinische Resultate und höhere Wassergehalte sowohl in den behandelten als auch in den benachbarten Bandscheiben im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auf die Bandscheibenhöhe hatte die ADCI-Therapie jedoch keinen Einfluss [12, 25, 36].

### 2.3.3 Trägermedien

Die in die Bandscheibe implantierten Zellen brauchen ein geeignetes Mikro-Umfeld, um zu überleben. Zum einen muss es den Zellen Halt geben, zum anderen durchlässig genug sein, die Diffusion von Nährstoffen und zellulären Abfallstoffen zuzulassen [17]. Ausserdem muss das Trägermedium eine erste Versorgung der implantierten Zellen mit Nährstoffen gewährleisten [7], eine hohe mechanische Belastbarkeit aufweisen, biokompatibel und sterilisierbar sein und für die Injektion eine möglichst geringe Viskosität besitzen [78]. Auf der anderen Seite birgt die Injektion einer flüssigen Zellsuspension die Gefahr, dass diese bei der ersten Belastung der Wirbelsäule wieder ausgepresst wird [7].

Es werden zur Zeit verschiedene Trägermedien getestet, die diesen teilweise konträren Ansprüchen gerecht werden sollen.

So wurden Hydrogele entwickelt, die in flüssigem Zustand injiziert werden und dann in situ unter Einfluss von Wärme, Licht oder chemischen Faktoren zu einem Gel polymerisieren [79-81].

Die verschiedenen Hydrogele werden unter anderem auf der Basis von Hyaluronsäure [7, 80], Fibrin [82], Alginat [83], Chitosan [84], Kollagen II [73] und Seidenfibroin [58], beziehungsweise aus Modifizierungen und Kombinationen dieser Substanzen hergestellt [85].

Das in der vorliegenden Studie verwendete *Albugel* basiert auf Maleimido-Albumin und Hyaluronsäure. Es wird mittels einer Doppelkammerspritze appliziert, die zweite Kammer enthält eine Vernetzerflüssigkeit aus Polyethylenglycol (PEG). Beim Zusammentreffen in situ polymerisieren die beiden Flüssigkeiten aufgrund chemischer Wechselwirkungen zu einer gallertartigen Substanz. Dieses System ermöglicht die einfache Injektion einer flüssigen Zellsuspension mittels minimalinvasiven Zugangs und gewährleistet gleichzeitig, dank der sofortigen Polymerisation, den Verbleib der Zellen in der Bandscheibe [7, 62].

Die Zusammensetzung des Hydrogels sorgt ausserdem für eine Suppression von Knochen- und Endothelzellen (keine Adhäsion am Gel somit keine Proliferation) und hemmt die Angiogenese, welche die degenerativen Prozesse weiter fördern würde [86].

Mit *Albugel* wurden bereits in vitro-Tests, subkutane Injektionen bei Ratten und ein Grossterversuch vorgenommen. Dabei konnte in vitro und im Rattenversuch eine zuverlässige in situ-Polymerisation des Hydrogels und, selbst nach Kryokonservation der Zellen, eine bandscheibentypische Matrixbildung der darin eingebetteten Chondrozyten gezeigt werden [7].

## 2.4 Tiermodell

### 2.4.1 Das Schaf als Modell für Bandscheibendegeneration

Als Tiermodell für die vorliegende Studie wurde das Schaf gewählt. Da ein Therapieansatz für die Humanmedizin getestet werden soll, ist eine gute Vergleichbarkeit mit der Situation im menschlichen Körper wichtig.

Bezüglich seiner anatomischen Dimensionen ähnelt das Schaf dem Menschen stark. Untersuchungen zeigen, dass die Achsenbelastung bei Quadrupeden gleich oder sogar höher ist als bei Zweibeinern, obwohl nicht das gesamte Gewicht des Oberkörpers auf ihnen lastet [87]. Schafe weisen zudem ein ähnliches Körpergewicht auf [88] und auch wenn die ovine Bandscheibe deutlich kleiner ist als die menschliche, so bleibt ein ähnliches Verhältnis von Endplattenfläche zu Bandscheibenhöhe bestehen [89, 90]. Der Bewegungsradius im Lendenwirbelbereich ist beim Schaf deutlich kleiner [91]. Dies ist jedoch auch bei den meisten anderen potentiellen Grosstiermodellen wie Kalb oder Schwein der Fall [92].

Doch nicht nur biomechanische und makroskopisch-anatomische Faktoren sondern auch histologische und biochemische Kriterien spielen eine entscheidende Rolle bei der Wahl des Tiermodells.



So bestimmt die Dicke der Endplatte die Diffusionsdistanz für Zu- und Abtransport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten. Ist diese Distanz deutlich kleiner, führt das zu einer veränderten Ernährungssituation innerhalb der Bandscheibe, welche die Ergebnisse von Experimenten massgeblich beeinflussen kann. Beim Menschen dient die Endplatte zugleich als alleinige Wachstumszone in der Wirbelsäule. Das Schaf hat jedoch, wie die meisten Säugetiere, zusätzliche Wachstumsfugen innerhalb der Wirbelkörper und somit eine verhältnismässig dünnere Endplatte [92]. Trotzdem ist die Ernährungssituation in der Bandscheibe von Grosstieren der von humanen ähnlicher als dies bei einigen anderen Tiermodellen der Fall ist, insbesondere bei kleinen Versuchstieren wie Kaninchen oder Sandratten [93].

Ähnlich wie beim Menschen finden sich auch beim Schaf bei Neugeborenen notochordale Zellen in der Bandscheibe. Bei beiden Spezies nimmt ihre Zahl mit zunehmendem Alter stark ab [94].

Beim Schaf wie beim Menschen finden sich ähnliche Kollagen- und Proteoglykangehalte in der Bandscheibe, ein vergleichbarer Wassergehalt im Nucleus [95], sowie ein ähnliches Hydratationsverhalten [96].

Schafe sind ausserdem vergleichsweise unkompliziert in Haltung und Umgang. Zudem wird die experimentelle Verwendung von üblicherweise landwirtschaftlich genutzten, fleischliefernden Tieren gesellschaftlich besser akzeptiert als dies zum Beispiel bei Hunden der Fall ist [97].

#### **2.4.2 Modell des Bandscheibenschadens**

Um die Situation im humanen Bandscheibenpatienten möglichst genau nachzuahmen, wird auch im Tiermodell meist mit bereits geschädigten Bandscheiben gearbeitet. Dafür können Tiere verwendet werden, bei denen spontan Bandscheibenvorfälle vorkommen. Dazu gehören zum Beispiel Sandratten [98, 99], Paviane [100, 101] oder Hunde, vor allem die

chondrodystrophen Rassen, bei denen die Knorpelbildung durch einen Gendefekt gestört ist [102]. Aber auch Mäuse können gentechnisch so verändert werden, dass spontane Bandscheibenprobleme auftreten [103, 104].

Die Alternative ist, Bandscheibenschäden mechanisch oder durch die Injektion matrix-schädigender chemischer Substanzen zu induzieren [105-107].

Eine mechanische Schädigung kann indirekt, zum Beispiel durch übermässige Kompression [108, 109], oder direkt durch eine chirurgische Schädigung der Bandscheibe erreicht werden. Belastungsinduzierte Schädigungen sind aus technischen Gründen in vivo nur beim kleinen Versuchstier durchführbar, bleibt also die chirurgische Verletzung der Bandscheibe als mechanisches Modell für den Grosstierversuch. Dabei kann entweder nur der Anulus fibrosus mittels Inzision geschädigt [110] oder durch eine Punktion zusätzlich Nucleusgewebe entfernt werden [111]. Oberflächliche Anulusinzisionen induzieren eine langsame Degeneration und sind somit geeignet, pathophysiologische Prozesse in der Bandscheibe zu erforschen [92, 93, 112]. Für die Untersuchung von Regeneration und Therapieansätzen werden tiefe Anulusschädigungen oder Punktionsmodelle als das Modell der Wahl angesehen, da sie eine schnellere Degeneration auslösen [92, 111, 113]. Für eine Schädigung mit substanziellem Effekt sollte der Durchmesser der Punktionsnadel mindestens 40% der Bandscheibenhöhe betragen [114].

In einer 2011 durchgeführten Grosstierstudie mit *Albugel* wurden die Bandscheiben zunächst mittels Punktion geschädigt und zwei Wochen später mit in Hydrogel eingebetteten Bandscheiben-Chondrozyten behandelt. Die Lebensdauer der Schafe nach der Injektion betrug sechs Monate. Die anschliessende Untersuchung der Bandscheiben lieferte erwartete Ergebnisse: eine fast komplette spontane Heilung sowohl der behandelten als auch der Kontrollbandscheiben [62]. Die vorliegende Studie soll nun mit einer

stärkeren Schädigung der Bandscheiben und einer kürzeren Überlebenszeit der Tiere weitere Erkenntnisse liefern.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Aufbau der Studie**

Für diese Studie wurden 21 Schafe als Versuchstiere eingesetzt. Drei davon fungierten als Spenderschafe für die Chondrozyten. Bei ihnen wurden in einer Operation die Bandscheiben zwischen den Wirbeln L1/2, L2/3, L3/4 und L4/5 partiell nukleotomiert. Drei Wochen später wurden die Schafe geschlachtet und die vorgeschädigten Bandscheiben entnommen. Aus dem bei der Schlachtung gewonnenen Material wurden im Zellkulturlabor Chondrozyten angezüchtet, welche später für die Behandlung der Bandscheiben der Empfängerschafe verwendet wurden.

Bei den 18 Empfängerschafen wurden in einer ersten Operation nur drei der vier oben genannten Bandscheiben geschädigt. Die Auswahl der zu schädigenden Bandscheiben sowie deren spätere Behandlung war randomisiert und erfolgte nach einem vorher festgelegten Verteilschlüssel (*Tabelle 1*).

Drei Wochen nach der partiellen Nukleotomie wurde bei den Empfängerschafen eine weitere Operation durchgeführt. Dabei wurden in eine der vorgeschädigten Bandscheiben Chondrozyten mit einem Hydrogel injiziert. In eine weitere Bandscheibe wurde nur das Hydrogel gespritzt. Eine Bandscheibe blieb bereits bei der Schädigungs-Operation *intakt* und die vierte wurde zwar in der ersten Operation *geschädigt*, blieb dann in der zweiten aber ohne Behandlung (*Tabelle 1*).

Von den Empfängerschafen wurden jeweils sechs Tiere 7, 11 oder 15 Wochen nach der Schädigungs-Operation geschlachtet und ihre Bandscheiben untersucht.

Die Durchführung des Versuchs erfolgte nach den aktuellen Vorschriften des Schweizer Tierschutzgesetzes und wurde vom Veterinäramt des Kantons Zürich bewilligt (Tierversuchsbewilligung Nr.144/2011).

Schaf-Nr.	Überlebenszeit nach der Schädigungs-OP	L 1/2	L 2/3	L 3/4	L 4/5	Spenderschaf
13.04	15 Wochen	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	13.01
13.05	15 Wochen	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	13.02
13.06	15 Wochen	Albugel	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	13.03
13.07	15 Wochen	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	Intakt	13.01
13.08	15 Wochen	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	13.02
13.09	15 Wochen	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	13.03
13.10	11 Wochen	Albugel	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	13.01
13.11	11 Wochen	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	Intakt	13.02
13.12	11 Wochen	Intakt	Geschädigt	Albugel	Albugel+Zellen	13.03
13.13	11 Wochen	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	13.01
13.14	11 Wochen	Albugel	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	13.02
13.15	11 Wochen	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	Intakt	13.03
13.16	7 Wochen	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	13.01
13.17	7 Wochen	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	13.02
13.18	7 Wochen	Albugel	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	13.03
13.19	7 Wochen	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	Intakt	13.01
13.20	7 Wochen	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	Geschädigt	13.02
13.21	7 Wochen	Geschädigt	Intakt	Albugel+Zellen	Albugel	13.03

*Tabelle 1: Behandlungsgruppen der Empfängerschafe*

### 3.2 Versuchstiere

Die in der vorliegenden Studie eingesetzten 21 weiblichen Schweizer Alpenschafe waren im Schnitt  $2.7 \pm 0.6$  Jahre alt und  $73.4 \pm 7.5$  Kilogramm schwer.

Sie stammen aus einer institutseigenen Herde, welche auf einem landwirtschaftlichen Betrieb mit täglichem Weidegang gehalten wird. Alle Tiere waren beim Ankauf klinisch gesund und serologisch negativ auf das Maedi/Visna-Virus. Sie zeigten in der Ultraschalluntersuchung keine Anzeichen

einer Trächtigkeit. Zum Ausschluss einer nicht erkennbaren frühen Trächtigkeit wurden die Schafe zudem mit Dinoprost (Dinolytic® ad us. vet., Pfizer AG, Zürich, Schweiz) behandelt. Jedes Frühjahr wurden die Schafe gegen Pasteurellen- und Clostridieninfektionen geimpft (Ovilis®Heptavac P, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz), im Frühjahr und Herbst gegen Moderhinke (Footvax® ad us. vet., Provet AG, Lyssach, Schweiz). Zur Parasitenbekämpfung wurde viermal jährlich Netobimin (Hapadex®, 4ml/10kg KG p.o., Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) und zweimal jährlich Doramectin (Dectomax®, 0.3ml/10kg KG s.c., Pfizer AG, Zürich, Schweiz) verabreicht.

Damit sich die Tiere ausreichend akklimatisieren konnten, wurden sie mindestens 8 Tage vor dem ersten OP-Termin in die institutseigenen Stallungen gebracht.

Um die Narkosefähigkeit der Schafe zu ermitteln, wurden die Tiere zwei Tage vor der OP einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen, es wurde ein Blutbild erstellt sowie Elektrolyte, Nieren-, Leber- und Muskelwerte im Blutserum bestimmt. Ausserdem wurden sie zu diesem Zeitpunkt gewogen und das Operationsfeld sowie der Hals im Bereich der V v.jugulares wurden geschoren.

Am Tag vor der Operation wurden die Schafe vom institutseigenen Stall in Stallungen nahe des Operationssaals transportiert. In den letzten 24 Stunden vor der Operation wurde den Tieren das Futter entzogen, sie hatten aber weiterhin freien Zugang zu Wasser.

### **3.3 Spendertiere**

#### **3.3.1 Operationsvorbereitung**

Am Tag der Operation wurde noch einmal eine klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt, um die Narkosefähigkeit der Tiere zu ermitteln.

Nach Wirkungseintritt der Prämedikation (*siehe* 3.3.2) wurden die Schafe vom Stall in den Operationsraum geführt. Dort wurde der ventrale Halsbereich chirurgisch vorbereitet und ein Venenverweilkatheter (BD Angiocath, BD Distribution Centre, Temse, Belgien) in die V. jugularis eingesetzt. Zur peri- und postoperativen Infektions-, Schmerz- und Entzündungsprophylaxe wurden Benzylpenicillin (Penicillin Natrium Streuli ad us. vet, 35 000 IE/kg KG, Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz), Gentamycin (Vetagent®, 4 mg/kg KG, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) und Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg KG, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) intravenös verabreicht. Nach dem Einleiten der Narkose und der Intubation wurden die Schafe auf dem Operationstisch in der erforderlichen Position gelagert, das Operationsfeld vom mittleren Thorakal- bis zum Beckenbereich noch einmal geschoren und anschliessend mit Hibiscrub® (CPS Cito Pharma Services GmbH, Uster, Schweiz), Alkohol (Ethanol ketoniert 80%, Kantonsapotheke Zürich, Zürich, Schweiz) und Desinfektionsspray (Hibitane®Tinktur, SSL Healthcare Schweiz AG, Reinach, Schweiz) aseptisch vorbereitet. Danach wurde das Schaf mit Ausnahme des Lendenwirbelbereiches mit sterilen Operationstüchern abgedeckt.

Während der Narkose erhielten die Tiere zur Tetanusprophylaxe 3000 IE eines equinen Tetanus-Antitoxin (Tetanus-Serum Intervet®, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz).

### **3.3.2 Anästhesie**

Die Prämedikation der Schafe erfolgte mit einer intramuskulären Applikation von Xylazin (Xylazin Streuli® ad us. vet., 0.1 mg/kg KG, Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz ) und Methadon (Methadon Streuli®, 0.2 mg/kg KG, Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz). Zur Einleitung der Anästhesie wurden Diazepam (Valium®, 0.1 mg/kg KG, i.v., Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz) oder Midazolam (Dormicum®, 0.1 mg/kg KG, i.v., Roche Pharma AG, Reinach,

Schweiz), Ketamin (Narketan®, 3-5 mg/kg KG, i.v., Vetquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und Propofol (Propofol 1%, MCT Fresenius, 0.4-0.6 mg/kg KG, i.v., Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz) verwendet. Nach lokaler Betäubung der Larynxschleimhaut mit Lidocainspray (Xylocain® 10% Spray, AstraZeneca AG, Zug, Schweiz) folgte die endotracheale Intubation. Die Narkose wurde mit Isofluran-Sauerstoff-Inhalation (max. 5% Isoflurananteil im Sauerstoff, Attane™ Isoflurane ad us. vet., Provet AG, Lyssach, Schweiz) und einer kombinierten Propofol-Ringerlaktat-Dauertropfinfusion (Spritzenpumpe, 1:100, Propofol 0.1 ml/kg/Std) aufrechterhalten.

Sobald nach der Operation der Schluckreflex wieder vorhanden war, wurde der Tubus entfernt und die erste postoperative Dosis Methadon verabreicht.

### **3.3.3 Schädigungs-Operation**

Bei den Spendertieren wurden vier Bandscheiben der Lendenwirbelsäule geschädigt (L1/2, L2/3, L3/4, L4/5). Für diese Operation wurden die Tiere sternal und um 45° in der Längsachse nach links gekippt gelagert. Der Zugang erfolgte von dorsolateral, ca. 3 cm rechts der Medianen. Mit einem Skalpell wurde ein Hautschnitt von ca. 30 cm Länge über den Lendenwirbeln 1 - 5 gemacht. Dann erfolgten die Präparation bis zur Fascia thoracolumbalis, die Inzision der Faszie und das stumpfe Durchtrennen der Rückenmuskulatur (M. longissimus lumborum und epaxiale Muskulatur). Die entsprechenden Wirbel wurden mit Hilfe markanter Knochenpunkte lokalisiert. Wenn nötig wurde dafür zusätzlich ein mobiles Röntgengerät (C-Bogen) eingesetzt. Der caudalste Wirbel, der in Kontakt mit einem Rippenköpfchen steht, wurde dabei als T 13 definiert. Diese Nomenklatur galt sowohl für alle Operationen als auch für die MRIs und für die nachfolgende Weiterverarbeitung und Untersuchung der Proben. Nach der Darstellung der jeweiligen Bandscheibe folgte deren Schädigung mittels einer 11G Knochenmarks-Biopsiestanze (Monoject™ Bone Marrow Biopsy/

Aspiration Needle, Kendall Healthcare, Covidien, Mansfield, USA). Diese wurde in die zu schädigende Bandscheibe eingeführt und fächerförmig innerhalb der Bandscheibe mehrmals vor- und zurückgeschoben.

Nach der Schädigung erfolgte die Spülung der Wunde mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0.9% Fresenius, Fresenius Kabi, Stans, Schweiz). Zum Wundverschluss wurde die Faszie in einzelnen U-Heften mit Polysorb<sup>TM</sup>0-Faden (Syneture, Covidien, Dublin, Irland) genäht, das subkutane Fett und die Unterhautnaht fortlaufend mit einer Kürschnernaht verschlossen (Ethicon Vicryl 2-0, Johnson&Johnson AG, Spreitenbach, Schweiz). Die Haut wurde mit einem Stapler (Appose<sup>TM</sup> ULC 35W, Medical Solution, Hünenberg, Schweiz) geklammert. Zum Schutz der Wunde wurde eine Kompresse als Decknaht mit Klammern befestigt.

### **3.3.4 Postoperatives Management**

Nach der Operation wurden die Tiere in den institutseigenen Stall zurücktransportiert und während der Aufwachphase intensiv überwacht.

Bereits bei der Extubation wurde den Schafen Methadon (*siehe 3.3.2*) verabreicht. Je eine weitere Gabe erhielten sie vier und acht Stunden später. Nach weiteren vier Stunden wurde Buprenorphin appliziert (Temgesic®, 0.01 mg/kg KG, i.m., Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz), um die Tiere über Nacht analgetisch zu versorgen.

An den drei der Operation folgenden Tagen wurden die Schafe weiterhin mit Penicillin (*siehe 3.3.1*) und Gentamycin (*siehe 3.3.1*) antibiotisch behandelt. Zur Schmerztherapie erhielten sie einmal täglich Carprofen (*siehe 3.3.1*).

Der Schutzverband wurde während vier Tagen auf der Wunde belassen. Die Klammern der Hautnaht wurden zehn Tage nach der Operation entfernt.



### **3.3.5 Probengewinnung**

Am Tag der Schlachtung wurden die Spenderschafe vom Stall zur Schlachthalle des Tierspitals transportiert. Dort wurden sie mittels Bolzenschuss und Blutentzug getötet, an den Hintergliedmassen aufgehängt und enthäutet. Die Entnahme der lumbalen Bandscheiben (L 1-5) erfolgte von ventral am ausgeweideten, hängenden Schlachtkörper. Mittels Skalpell wurden sie entlang der Wirbelkörper vorsichtig herauspräpariert.

## **3.4 In-vitro Kultivierung der Bandscheiben-Chondrozyten**

### **3.4.1 Herstellung von sterilem Schafserum**

Für die Kultivierung der Bandscheiben-Chondrozyten im Zellkulturlabor wurde steriles Schafserum hergestellt. Dafür wurde drei Schafen aus der institutseigenen Herde über ein Transfusionsbesteck Blut aus den Vv. jugulares abgenommen. Das Blut des jeweiligen Tieres wurde in einem 1000ml Glaszylinder gesammelt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Blutkuchen sorgfältig mit einer Plastikpipette von der Zylinderwand gelöst. Der Glaszylinder wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Danach konnte das Blutserum mittels Dekantierung in 50ml Plastikröhrchen gesammelt werden. Diese Röhrchen wurden zweimal während 20min bei 2000g zentrifugiert, damit sich die restlichen Feststoffe absenkten. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in frische Röhrchen überführt und bei minus 20°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die benötigte Menge Serum aufgetaut und steril filtriert. Das Serum wurde von Mitarbeitern des Institutes vor Beginn der Studie hergestellt.

### **3.4.2 Isolation, Kultivierung und Einfrieren der Bandscheiben-Chondrozyten**

Bei der Schlachtung der Spendertiere wurden die vorgeschädigten Bandscheiben entnommen und in einen zuvor gewogenen Verdauzyylinder mit 100ml sterilem PBS (DPBS, LONZA GmbH, Basel, Schweiz) und 0.5ml Gentamycin (Invitrogen™, Basel, Schweiz) gegeben. Dieser wurde auf Eis gestellt und so zum Zellkulturlabor transportiert. In Petrischalen wurden mit sterilen Skalpellen Bindegewebe und Blutgefäße vom Material wegpräpariert und das restliche Gewebe zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden dann wieder in den Verdauzyylinder überführt. Dieser wurde erneut gewogen, das vor der Schlachtung ermittelte Gewicht von Zylinder und Flüssigkeit abgezogen und so das Gewicht des Bandscheibengewebes errechnet.

Anschliessend wurden die Bandscheibenstückchen zweimal mit einer sterilen PBS+/Gentamicin-Lösung (DPBS+CaCl<sub>2</sub>+MgCl<sub>2</sub>, LONZA GmbH, Basel, Schweiz) gewaschen. Sobald die Spüllösung klar war, konnte diese abpipettiert und durch das Verdaumedium ersetzt werden. Die Verdauzyylinder wurden nun für 4h bei 37°C und 80rpm in einem Lab Therm Kühner-Schüttler (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz) inkubiert.

Die Zusammensetzung des Verdaumediums sowie die weitere Isolation der Chondrozyten erfolgten gemäss einem Protokoll des Projektpartners, welches aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht werden kann.

Nach erfolgreicher Zellisolation wurde in einem Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) mit 20µl Trypanblau und 80µl Zellsuspension die Zellzahl ermittelt. Blau angefärbte Zellen wurden als tot definiert und nicht mitgezählt. Pro T75 Zellkulturflasche (Zellkulturflasche mit Filterkappe, BD Falcon, Milian AG, Genf, Schweiz) wurden für die erste Vermehrung 1 Mio. Zellen in Nährmedium auf der Basis von DMEM/F-12 (Lonza GmbH, Köln, Deutschland) ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach erneuter Zellzählung und Vitalitätstestung (siehe unten) folgte eine zweite Aussaat mit ca. 500'000 Zellen

pro T75-Zellkulturflasche und Inkubation mit frischem Nährmedium unter denselben Bedingungen.

Die Supplementierung der Nährmedien beruht auf einem nicht zur Veröffentlichung freigegebenen Protokoll des Projektpartners.

Sobald die Zellen 90% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie portionenweise eingefroren. Dafür wurden der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen dann mit 5ml 1x Trypsin (Trypsin-EDTA 0.25%, GIBCO®, Invitrogen™, Basel, Schweiz) geerntet. Nach erfolgreicher Vereinzelung wurde das Trypsin durch sofortige Zugabe von 0.5ml sterilem Schafserum inaktiviert, um einen Verdau der Zellen zu verhindern. Die Zellzahl wurde erneut wie oben beschrieben bestimmt. Anschliessend wurden die Zellen mit Einfriermedium bestehend aus 70% Basismedium (Basic Medium DMEM/F12, LONZA GmbH, Köln Deutschland) 20% ovinem Serum (*siehe 3.4.1*) und 10% DMSO (Sigma-Aldrich®, Buchs SG, Schweiz) in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml resuspendiert, sodass schliesslich 1 Mio. Zellen pro Kryofläschchen eingefroren werden konnten.

Von dieser Zellsuspension wurde je 1ml in 1.8ml-Kryofläschchen pipettiert und die Fläschchen in einen Isopropanol-Gefrierbehälter (Mr Frosty, Nalgene, Sigma-Aldrich®, Buchs SG, Schweiz) überführt. Dieser Behälter wurde für 2 Stunden bei -20°C gelagert und anschliessend über Nacht bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Kryofläschchen aus dem Gefrierbehälter entnommen und bis zur Verwendung in Flüssigstickstoff gelagert.

Vor dem Einfrieren wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Dazu wurden einige Mikroliter der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 bis 48 Stunden Inkubationszeit wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen beobachtet.

Zwei Tage nach dem Einfrieren der Zellen wurde ausserdem ein Aliquot aufgetaut und kultiviert, um die Vitalität der Zellen nach dem Gefrierprozess

zu testen. Diese Zellen wurden vom Projektpartner mittels PCR auf Chondrozytenmarker untersucht.

### **3.4.3 Auftauen, Kultivierung und Präparation der Bandscheiben-Chondrozyten für die Implantation**

Fünf Tage vor der jeweiligen Implantations-Operation wurde ein Kryofläschchen pro Empfängertier aufgetaut. Dazu wurde das Fläschchen in der Hand erwärmt, bis keine Eiskristalle in der Zellsuspension mehr sichtbar waren. Unmittelbar anschliessend wurde die Suspension in ein 15ml-Kunststoffröhrchen überführt, in welches zuvor 10ml Nährmedium pipettiert worden war. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation mit einer relativen Zentrifugalkraft von 240 wurden der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 14ml Nährmedium resuspendiert und in einer T75 Zellkulturflasche bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> bis zu einer Konfluenz von 70-90% kultiviert.

Die sterilisierten Doppelkammerspritzen (anwendungsspezifische Entwicklung des Projektpartners, *Abbildung 1*) wurden maximal 48 Stunden vor der Implantations-Operation vorbereitet. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und gezählt. Danach wurde die Zellsuspension mit Transportmedium (entsprechend dem vertraulichen Protokoll des Projektpartners) verdünnt, sodass schliesslich 2 Millionen Zellen mit 2ml *Albugel* vermischt und unter sterilen Bedingungen in die grössere der beiden Spritzenkammern verbracht werden konnten. In die kleinere Kammer wurde die Vernetzerflüssigkeit gefüllt. Die Spritze wurde mit einem Mischaufsatz versehen und mit einem Schraubdeckel abgedichtet. Zur eindeutigen Identifikation wurde die Spritze mit Projektnummer, Datum, Initialen der verantwortlichen Person, Nummern von Spender- und Empfängertier und dem zu behandelnden Bandscheibenfach beschriftet. Danach folgte das Einpacken in zwei Lagen steriler Alufolie, wobei die äussere Schicht ebenfalls wie oben

beschrieben gekennzeichnet wurde. Die verpackten Spritzen wurden mit dem Verschluss nach oben stehend in Bechergläsern bei 4°C gelagert.

Am Tag der Operation wurden die Bechergläser mit den jeweils benötigten Spritzen in einer Styroporkiste mit Kühlelementen zum Operationssaal transportiert.

### **3.5 Empfängertiere**

#### **3.5.1 Operationsvorbereitung, Anästhesie und postoperatives Management**

Operationsvorbereitung, Anästhesie und postoperatives Management der Empfängertiere wurden bei beiden Operationen der Empfängertiere gemäss der Beschreibung in den entsprechenden Abschnitten im Kapitel Spendertiere (3.3.1, 3.3.2, 3.3.4) durchgeführt.

#### **3.5.2 Schädigungs-Operation**

Auch bei den Empfängertieren fand eine Schädigungs-Operation statt. Sie erfolgte analog zu der Operation der Spendertiere (3.3.3). Bei den Empfängertieren wurden jedoch nur drei Bandscheiben geschädigt (*Tabelle 1*).

#### **3.5.3 Implantations-Operation**

Bei den Empfängerschafen wurde zusätzlich eine Implantations-Operation durchgeführt. Dabei wurden in eine der vorgeschädigten Bandscheiben Chondrozyten mit dem Hydrogel injiziert. In eine weitere Bandscheibe wurde nur das Hydrogel gespritzt. Eine Bandscheibe blieb bereits bei der Schädigungs-Operation *intakt* und die vierte wurde zwar in der ersten Operation *geschädigt*, blieb dann in der zweiten aber ohne Behandlung (*Tabelle 1*).

Für die Implantations-Operation wurden die Schafe sternal gelagert und dann um 45° in der Längsachse nach rechts gekippt. Der Zugang erfolgte von dorsolateral links. Bei 16 Schafen wurde ein offener Zugang wie bei der Schädigungs-Operation gewählt. Bei zwei Tieren (13.06 und 13.07) erfolgte die theapeutische Injektion via Hautschnitt, wobei die zu behandelnden Bandscheiben vorher mittels Durchleuchtung (C-Bogen) lokalisiert worden waren. Eine 13G-Biopsiestanze (Monoject™ Bone Marrow Biopsy/ Aspiration Needle, Kendall Healthcare, Covidien, Mansfield, USA) wurde in die jeweilige Bandscheibe eingeführt und die genaue Platzierung noch einmal mit dem C-Bogen überprüft. Der Mandrin wurde entfernt und eine Injektionskanüle in die Stanze eingeführt. Unterdessen wurde die steril verpackte Doppelkammerspritze von einer Hilfsperson mit sterilen Handschuhen ausgepackt und in der Hand eine Minute lang vorgewärmt. Eventuell vorhandene Luftblasen im *Albugel* oder in der Vernetzerflüssigkeit wurden durch vorsichtiges Klopfen mit dem Finger an die Oberfläche gebracht. Der Verschluss wurde entfernt und ein Tropfen auf eine sterile Folie gedrückt, um zu kontrollieren, ob zwischen *Albugel* und Vernetzer eine Polymerisation stattfindet. Die Spritze wurde dann dem Operateur übergeben, der sie auf der Injektionskanüle festschraubte und das Gel langsam in die Bandscheibe injizierte. Die Spritze wurde bis zur Polymerisation während einiger Minuten auf der Kanüle belassen. Danach wurden Spritze, Kanüle und Stanze entfernt. Der Hautschnitt wurde mit einem Stapler geklammert und einer Gaze abgedeckt. Beim offenen Zugang erfolgte der Wundverschluss analog zur Schädigungs-Operation der Spendertiere (3.3.3).

### **3.6 Probengewinnung und -aufbereitung**

Am Tag der Schlachtung wurden die Schafe vom Stall zur Schlachthalle des Tierspitals Zürich transportiert. Dort wurden sie mittels Bolzenschuss und Blutentzug getötet. Nach Entfernen des Fells wurde das benötigte Wirbelsäulensegment mit anliegender Muskulatur herausgesägt (T 10 – L 7). Als erstes folgte die magnetresonanztomographische Untersuchung (MRI) der noch intakten Lendenwirbelsäule. Danach wurden Fett und Muskulatur vom Knochen abpräpariert und die zu untersuchenden Bandscheiben mit den jeweils angrenzenden Wirbelendplatten herausgesägt. Diese Scheiben wurden noch einmal sagittal halbiert. Während die rechte Hälfte für die histologische Untersuchung zur Fixierung in eine 4%Formalinlösung gelegt wurde, wurde bei der linken die Bandscheibe vorsichtig mit einem Skalpell herauspräpariert und fotografiert. Diese Bandscheibensegmente wurden in Plastikröhrchen gegeben, mittels Flüssigstickstoff schockgefroren, bei -80 C gelagert und später biochemisch bzw. mittels RT-PCR untersucht.

#### **3.6.1 Magnetresonanztomographische Untersuchung**

Unmittelbar nach der Schlachtung wurden die herausgetrennten Lendenwirbelsäulen im Magnetresonanztomographen (Ingenia 3T, Philips Medical Systems AG, Zürich, Schweiz) des Tierspitals Zürich untersucht.

Die Lendenwirbelsäulen wurden in der Kopf-Hals-Spule in Rückenlage und mit dem kranialen Teil voran in das Gerät gelegt.

Es wurden sagittale und transversale T1-gewichtete und eine Reihe von T2-gewichteten Aufnahmen angefertigt (sagittal, dorso-ventral, TSE Drive HR, TSE Spir dorso-ventral).

### **3.6.2 Herstellung der histologischen Schnitte**

Die für die histologische Untersuchung bestimmte rechte Hälfte der Bandscheiben-Wirbel-Scheibe wurde nach der Schlachtung während 48h in 4%iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschliessend wurden die Proben 20min mit fliessendem Leitungswasser gespült, um das Formalin wieder zu entfernen. Dann folgte die Entkalkung mit EDTA (25%, pH 7.0-7.4). Da dies bei den in den Probengefässen liegenden Bandscheiben nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurden die Gewebestückchen in Gazesäckchen verpackt und in einem mit EDTA gefüllten Glaszylinder aufgehängt. Der Zylinder wurde in Alufolie eingepackt, um die Proben vor Licht zu schützen, und dann auf dem Magnetrührer gelagert (200-300rpm. MR Hei-Standard, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland). Einmal pro Woche wurde die EDTA-Lösung gewechselt. Bei den ersten Präparaten wurde versucht, die Knochensubstanz zusätzlich mittels Ultraschall (Piezosurgery unit, Mectron Srl, Carasco, Italien) zu entfernen, was sich aber als nicht zweckdienlich herausstellte.

Nach 18 Wochen wurde an einem Präparat getestet, ob die Probe vollständig entkalkt war. Da es zu diesem Zeitpunkt möglich war, den knöchernen Anteil mit dem Skalpell zu durchtrennen, konnten die Präparate weiterverarbeitet werden.

Vor der Einbettung in Paraffin wurden die Proben 30min mit fliessendem Leitungswasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Xylol als Intermedium schliesslich mit Paraffin infiltriert. (Leica Histoprocessor ASP200S, Biosystems, Nunningen, Schweiz, Programm Bone+IVD 85h)

Nach diesem Prozess wurden die Bandscheiben-Knochen-Scheiben noch einmal mit einem Skalpell halbiert, mit der frischen Schnittfläche nach unten in die Ausgiessform gelegt und mit Paraffin übergossen. Sobald das Paraffin vollständig ausgehärtet war, konnten die Probenblöcke aus den Kassetten herausgenommen werden.



Aus diesen Blöcken wurden mit dem Mikrotom (Leica RM 2235 Rotationsmikrotom, Biosystems, Nunningen, Schweiz) drei Mikrometer dicke Schnitte angefertigt, die anschliessend mit sechs verschiedenen Färbungen angefärbt wurden.

Zur Beurteilung der allgemeinen Struktur wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt. Die Kollagene wurden mittels der Pikrosiriusrot-Färbung (PR) sichtbar gemacht, der Glykosaminoglykan-Anteil mittels der Alcianblau-Periodic-Acid-Schiffs-Färbung (AB-PAS).

### **3.6.3 Herstellung der immunhistochemischen Schnitte**

Zur Herstellung von immunhistochemischen Präparaten wurden die entparaffinierten Schnitte zuerst mit Hämalaun gegengefärbt, dann mit Proteinase K (Proteinase K, Dako, Baar, Schweiz) vorbehandelt (15min, Raumtemperatur), um die Antigene freizulegen. Danach wurden die endogene Peroxidase ausgeschaltet (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O + 0,2% NaN<sub>3</sub> in entionisiertem Wasser, 10min, Raumtemperatur) und mit einem Protein-Block (Protein Block Serum-Free, Dako, Baar, Schweiz, 10min, Raumtemperatur) die Unspezifität blockiert.

Es wurden primäre Antikörper gegen Kollagen I (Kaninchen anti Kollagen I, Novus Biological, NBP1-30054, LOT SH212P, Verdünnung 1:100), Kollagen II (Kaninchen anti Kollagen II, Novus Biological, NBP1-77795, LOT 24212, Verdünnung 1:100) und Aggrekan (Maus anti Aggrekan, Novus Biological, NB110-6524, LOT150709, Verdünnung 1:10) verwendet.

Die Präparate wurden mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht inkubiert. Dann folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti Mouse/ anti Rabbit, Dual Link System, Dako, Baar, Schweiz, 20min, Raumtemperatur) und die Entwicklung mit einer DAB-

Substratchromogenlösung (Dual Link System (DAB+), Dako, Baar, Schweiz, 10-20min unter mikroskopischer Kontrolle).

Zum Schluss wurden alle Präparate mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

### **3.6.4 Aufbereitung des Gewebes für die Untersuchung der Genexpression und der biochemischen Parameter**

Die linken Bandscheibenhälften wurden auf Trockeneis zum Projektpartner transportiert. Die weitere Untersuchung dieser Proben wurden vom Projektpartner im eigenen Labor durchgeführt.

Das gefrorene Gewebe wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem sterilen Mörser zerrieben und danach mit einer dem Probengewicht angemessenen Menge RLT-Puffer (aus RNeasy Mini-Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) 5min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen aufzuschliessen und die RNase zu inaktivieren. Das Gewebepulver wurde anschliessend abzentrifugiert (1min, 10000rpm) und mittels Papainverdau weiterverarbeitet, während der Überstand für die Real Time RT PCR verwendet wurde.

### **3.6.5 Biochemische Untersuchungen**

Zur Beurteilung der Knorpel-Ähnlichkeit der Bandscheiben wurden DNA-, Glykosaminoglykan- und Kollagengehalt der Gewebeproben bestimmt.

Für die Bestimmung dieser biochemischen Parameter wurde das unter 3.6.4 hergestellte Zentrifugat mit Papain (1mg/ml, Papain P-4762, Sigma-Aldrich®, Hamburg, Deutschland) in einer Pufferlösung (pH 6.0) aus 0.1 M Na-Acetat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0.01 M L-Cysteinhydrochlorid (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland), 0.05 M Na<sub>2</sub>-EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0.2 M NaCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) über Nacht bei 60°C verdaut.

Bei unvollständigem Verdau über Nacht wurde der Geweberest abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Sediment mit den gleichen Reagenzien noch einmal über Nacht bei 60°C weiterverdaut.

#### ***3.6.5.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes***

Der Zellgehalt der Bandscheibenhälften wurde durch Fluoreszenz-Photometrie ermittelt. Dafür wurden verschiedene Verdünnungen des Probenmaterials hergestellt, jeweils die gesamte DNA mit PicoGreen- Fluoreszenzfarbstoff (P-7581, Molecular Probes, Darmstadt, Deutschland) angefärbt und deren Extinktion dann im Fluoreszenzphotometer gemessen (PHERAstar BMG Labtechnologies, Extinktion: 485nm, Emission: 520nm) Zur Bestimmung des absoluten DNA-Gehaltes der Proben wurden die so erhaltenen Messwerte mit einer Standardkurve bekannter Konzentrationen von  $\lambda$ -DNA verglichen.

#### ***3.6.5.2 Bestimmung des Kollagengehaltes***

Um den Kollagengehalt zu bestimmen, wurde ein Hydroxyprolin-Assay durchgeführt. Dieser basiert auf einer sauren Hydrolyse mit Natriumhydroxid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Nr.6771, M=40,01 g/mol), bei der Hydroxyprolin freigesetzt wird, und einer anschliessenden Oxidation des Hydroxyprolins durch Chloramin T (C-9887, Sigma-Aldrich®, Hamburg, Deutschland, M=227,6 g/mol). Zum Schluss wird Dimethylaminbenzaldehyd (D-8904, Sigma-Aldrich®, Hamburg, Deutschland, M=149,2 g/mol) zugesetzt. Dieses bildet einen roten Farbkomplex mit dem oxidierten Hydroxyprolin, dessen Extinktion dann mit einem Photometer (FluoStar Optima BMG Labtechnologies) bei einer Wellenlänge von 570nm gemessen werden kann. Zum Erstellen einer Standardkurve diente ein Gelatine-Hydrolysat (Sol LDA, 50141-GE\_0092, Gelita AG, Memmingen, Deutschland).

### **3.6.5.3 Bestimmung des Glykosaminoglykangehaltes**

Der Gehalt an Glykosaminoglykan (GAG) wurde mit Hilfe des Dimethylmethylenblau(DMMB)-Assay bestimmt. Dabei bildet GAG zusammen mit Ethanol und DMMB (Serva, Heidelberg, Deutschland, Nr.:20335; M=347,9 g/mol) einen blauen Farbkomplex, dessen Extinktion mit einem Photometer (PHERAstar BMG Labtechnologies) bei einer Wellenlänge von 520nm gemessen wurde.

Zur Stabilisierung des Farbkomplexes wurde Guanidiniumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland, Art.Nr. 1.04220.0100; 95,54 g/mol) eingesetzt, als Standard wurde Chondroitinsulfat (C-4384, Sigma-Aldrich®, Hamburg, Deutschland) mitgeführt.

### **3.6.6 Genexpressionsanalyse**

#### *RNA-Isolation und Real Time RT PCR*

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Isolation erfolgte gemäss dem Qiagen RNeasy-Protokoll. Dabei wurde der Überstand mit den lysierten Zellen zuerst mittels QiaShredder homogenisiert. Anschliessend wurde die RNA an der QiaSäule gebunden, mit RW1- und RWE-Puffer gewaschen und zum Schluss mit DNase-freiem Wasser eluiert.

Nach erfolgreicher RNA-Isolation wurde die Probe im SpeedVac auf etwa die Hälfte des Volumens aufkonzentriert.

Mit dem Transkriptase Core Kit (Eurogentec) wurde anschliessend die gesamte isolierte RNA in die dazu komplementäre cDNA umgeschrieben. Dafür liess man im Thermocycler (Whatman Biometra, Thermocycler T3000) ein Reverse Transkriptase - Programm mit einer 10-minütigen Initiationsphase (25°C) zur Primerbindung, einer 30-minütigen Transkriptionsphase (48°C) und einer 5-minütigen Inaktivierungsphase der Reversen Transkriptase bei 95° C laufen.

Es wurden 150 nanomolare Primerlösungen (für Kollagen X: Eurofins, Hamburg, Deutschland, für all anderen: BioTez, Berlin-Buch, Deutschland) verwendet. Bei der Untersuchung auf Interleukin-1 wurde die Konzentration auf 75 nanomol gesenkt, da sonst zu viele Nebenprodukte auftraten.

Mittels Real Time PCR wurde die Genexpression von AP, Hyaluronansynthase 2 und 3, Interleukin-1, Kollagen 1-A2, Kollagen 2-A1, Kollagen 10 und Lubricin analysiert. GAPDH und  $\beta$ -Aktin wurden als Referenzgene verwendet.

### 3.7 Auswertung

#### 3.7.1 Makroskopische Aufnahmen

Die Fotografien der aufgeschnittenen Bandscheibenhälften wurden in Anlehnung an das Thompson-Grading [115] (*Tabelle 2*) nach folgenden Kriterien beurteilt:

Score	Nucleus	Anulus	Abgrenzbarkeit Nucleus/ Anulus	Farbe
1	gelartige Masse	keine Veränderungen, diskrete fibröse Lamellen	vollständig	keine Verfärbungen
2	verdichtete, fibröse Anteile	Einstich sichtbar / teilweiser Verlust der feinen Lamellenstruktur	teilweise	leichte / fokale Verfärbungen
3	komplett verändertes Gewebe	grössere Läsion durch Einstich / hochgradiger Strukturverlust, Kavernenbildung	nicht möglich	starke / multifokale / generalisierte Verfärbungen

*Tabelle 2: Auswertungskriterien für die makroskopischen Aufnahmen der Bandscheiben nach der Schlachtung*

#### 3.7.2 Magnetresonanztomographische Aufnahmen

Die sagittalen und dorso-ventralen T2-gewichteten MRI-Bilder wurden mit Hilfe des Pfirrmann-Gradings [116] (*Tabelle 3*) ausgewertet. Alle Bandscheiben zwischen L1 und L5 wurden je drei Mal blind beurteilt. Für die statistische

Analyse wurde dann der Durchschnitt dieser drei Wertungen dem Behandlungsschema zugeordnet.

Pfirrmann Grad	Struktur der Bandscheibe	Abgrenzbarkeit Nucleus/ Anulus	Signalintensität	Höhe des Bandscheibenraums
I	homogen, weiss	klar	hyperintens, isointens zu Liquor	normal
II	inhomogen mit/ ohne horizontalen Banden	klar	hyperintens, isointens zu Liquor	normal
III	inhomogen, grau	unklar	intermediate	normal bis gering verringert
IV	inhomogen, grau oder schwarz	nicht möglich	intemediate bis hypointens	normal bis ausgeprägt verringert
V	inhomogen, schwarz	nicht möglich	hypointens	kollabiert

*Tabelle 3: Pfirrmann-Grading für die Beurteilung der Bandscheiben im MRI*

Zusätzlich wurden im Programm OsiriX die Höhe des Bandscheibenraums, also der Abstand der Endplatten in der Mitte der Wirbelkörper, und der Winkel zwischen den angrenzenden Endplattenflächen gemessen.

### 3.7.3 Histologische Schnitte

Bei der *HE-Färbung* wurden die Zelldichte und die Anzahl und Grösse der Chondrozytencluster im Nucleus einzeln nach folgendem Schema (*Tabelle 4, Abbildungen 2-6*) beurteilt:

Score	Zelldichte	Zellcluster	Anzahl Zellen pro Cluster
1	- -	keine	2 - 3
2	-	vereinzelte	4 - 6
3	- / +	stellenweise	≥ 7
4	+	viele	
5	+ +		

*Tabelle 4: Auswertungskriterien für die HE-Präparate*

Für die Auswertung der anderen Präparate wurden jeweils drei Zonen unterschieden (Tabelle 5):

Zone 1	Zone 2	Zone 3
Übergangsbereich äusserer / innerer Anulus	Übergangsbereich innerer Anulus / Nucleus	Nucleus

Tabelle 5: Auswertungszonen der histologischen Präparate

In der *AB-PAS-Färbung* werden stark saure, grosse Glykosaminoglykan-Moleküle blau angefärbt, schwach saure oder neutrale stellen sich purpurn dar. Beurteilt wurde jeweils der Flächenanteil von blau oder purpurn angefärbten Arealen in den verschiedenen Zonen (Tabelle 6, Abbildungen 9, 10).

Score	Flächenanteile
0	0%
1	1 – 25%
2	26 – 50%
3	> 50%

Tabelle 6: Auswertungskriterien für die AB-PAS-Präparate

Bei den mit *Pikrosiriusrot* gefärbten Präparaten wurde in allen Zonen nach granulären Veränderungen [1] gesucht und diese, falls vorhanden, gemäss ihres Flächenanteils bewertet (Tabelle 7, Abbildungen 7, 8).

Score	Granuläre Veränderungen	Flächenanteile
0	nicht vorhanden	0%
1	vorhanden	< 5%
2		5 – 20%
3		> 20%

Tabelle 7: Auswertungskriterien für die Pikrosiriusrot-Präparate

### 3.7.4 Immunhistochemische Schnitte

Bei allen immunhistochemischen Präparaten wurden sowohl der Flächenanteil als auch die Farbintensität der jeweils angefärbten Strukturen (Kollagen I, Kollagen II, Aggrecan) in allen drei Zonen als einzelne Kriterien beurteilt. Bei der Farbintensität wurden jeweils alle Präparate einer Färbung vergleichend bewertet (*Tabelle 8, Abbildungen 11-20*).

Score	Flächenanteile	Farbintensität
0	0%	keine Färbung
1	1 – 25%	blasse Färbung
2	26 – 50%	mittlere Färbung
3	> 50%	intensive Färbung

*Tabelle 8: Auswertungskriterien für die immunhistochemische Präparate*

### 3.7.5 Biochemische Auswertung

Die Menge der drei biochemischen Parameter wurde jeweils im Verhältnis zum Gewebe-Nassgewicht (ww) gemessen. So wurden der Kollagengehalt in  $\mu\text{g}/100\text{mg}$  Gewebe-Nassgewicht angegeben, die DNA- und Glykosaminoglykangehalte in  $\mu\text{g}/1\text{mg}$ .

### 3.7.6 Auswertung der Genexpressionsanalyse

Die Rohdaten für die Real Time PCR wurden im Taqman-System (Applied Biosystems®7500 Fast System SDS v1.4 21 CFR Part 11 Module) generiert und gemäss der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode analysiert [117].

Bei einem  $C_t$ -Wert von  $\geq 40$  galt das entsprechende Gen als nicht exprimiert.

## 3.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics 20) auf statistisch signifikante Unterschiede und Korrelationen geprüft. Aus den



Daten wurde mittels deskriptiver Statistik Mittelwerte und Standardabweichung berechnet, ausserdem wurden sie einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Als Post-Hoc Tests wurden jene nach Bonferroni und Scheffé verwendet, für die Korrelation der einzelnen Parameter wurde die Auswertung nach Pearson durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von  $<0.05$  angesehen.

## **4 Resultate**

### **4.1 Versuchstiere**

Im Allgemeinen haben die Schafe die Anästhesie und den chirurgischer Eingriff gut vertragen. Die Tiere 13.04 und 13.07 zeigten direkt nach der Schädigungs-Operation eine leichte Hinterhandschwäche, die jedoch innerhalb der ersten Stunden postoperativ verschwand. Das Tier 13.07 zeigte nach der Implantation eine Parese der rechten Hinterhand mit fehlender Propriozeption. Das Schaf wurde mit einem Neurostimulans (B-Neuron ad us. vet., 4ml s.c., Vétoquinol, Ittigen, Schweiz) behandelt und die betroffene Gliedmasse wurde im distalen Bereich mit einem Polsterverband geschützt. Nach 4 Tagen war die Propriozeption wieder vorhanden und der Verband konnte entfernt werden. Die Lahmheit war bis zur Schlachtung sichtbar, das Tier konnte jedoch sicher stehen und gehen und zeigte keine Anzeichen von Schmerzen.

Bei 6 Tieren (13.01, 13.02, 13.03, 13.05, 13.10 und 13.20) entstanden aufgrund von Gefässrupturen mittlere bis stärkere Blutungen während einer der Operationen. Postoperative Symptome aufgrund des Blutverlustes zeigte aber nur das Schaf 13.10. Es wurde bereits intraoperativ mit HAES-Infusionen behandelt, in der Folgewoche wurde dem Tier zusätzlich Kraftfutter angeboten, um die Blutbildung zu unterstützen. Innert 48 Stunden hatten sich Allgemeinzustand und Schleimhautfarbe des Schafs wieder normalisiert.

## 4.2 Operationstechnik

Die Schädigungs-Operationen verliefen ohne Komplikationen. Aufgrund der engen anatomischen Verhältnisse in der Schafbandscheibe war das Eindringen mit der Biopsiestanze zum Teil schwierig, konnte aber immer erfolgreich durchgeführt werden.

Der als externe Polymerisationskontrolle dienende Hydrogeltropfen verfestigte sich bei allen Operationen innerhalb der geforderten 5 Minuten.

Bei den Implantations-Operationen sollte die Injektion von *Albugel/ Albugel plus Zellen* ursprünglich perkutan durchgeführt werden. Zur besseren Orientierung wurde entschieden, in jedem Fall einen Hautschnitt über den zu behandelnden Bandscheiben zu machen. Auf diese Weise konnten jedoch nur zwei Tiere operiert werden. Bei den 16 Schafen mit gutem bis sehr gutem Ernährungszustand und ausgeprägter Rückenmuskulatur war ein offener chirurgischer Zugang nötig, um die jeweiligen Bandscheiben sicher zu lokalisieren. Auch bei der Implantations-OP erschwerten die engen Verhältnisse in den Schafbandscheiben teilweise das Eindringen mit der Kanüle und das Einspritzen des Hydrogels. Die nötige Mindestmenge an *Albugel/ Albugel plus Zellen* konnte aber bei allen Bandscheiben appliziert werden.

Beim Tier 13.12 wurde die Spritze mit *Albugel plus Zellen* irrtümlich in L4/5 statt wie geplant in L2/3 injiziert. Daraufhin wurde auch der Applikationsort von *Albugel* geändert, sodass sich keine Konsequenzen auf die Auswertung der Studie ergaben.

## 4.3 Probengewinnung und -aufbereitung

Nach der Schlachtung konnten alle Lendenwirbelsäulen ohne Probleme entnommen und danach die Bandscheiben für die einzelnen Untersuchungsmethoden aufbereitet werden. Die Entkalkung der Proben für die Histologie erwies sich als aufwändiger als erwartet. So mussten die

Wirbelsäulenstückchen einzeln in Gaze verpackt in einem Glaszylinder mit EDTA aufgehängt werden und darin 18 Wochen statt wie geplant nur 12 Wochen verbleiben. Auch das Schneiden der Paraffinblöcke war technisch anspruchsvoll. Durch die Konsistenzunterschiede zwischen Knochen- und Bandscheibenmaterial entstanden in einigen Fällen Artefakte wie Risse oder Löcher im Bandscheibengewebe.

#### **4.4 Makroskopische Auswertung**

Sieben Bandscheiben konnten nicht makroskopisch bewertet werden. Bei Schaf 13.13 wurde vermutlich beim Fotografieren die *geschädigte* Bandscheibe (L1/2) mit der *intakten* (L2/3) vertauscht. Deswegen wurden diese beiden Bandscheiben von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Die Bandscheibe L2/3 von Schaf 13.04 wurde ebenfalls ausgeschlossen, da sie hochgradige Veränderungen aufwies, die vermutlich nicht mit dem getesteten Material in Verbindung stehen. Bei der Schlachtung von Tier 13.17 wurden keine Fotos gemacht, sodass diese vier Bandscheiben ebenfalls nicht bewertet werden konnten.

Die restlichen 65 Bandscheiben konnten wie vorgesehen im Bezug auf Struktur, Farbe und Abgrenzbarkeit von Anulus und Nucleus beurteilt werden (3.7.1, Tabelle 2).

Bei der makroskopischen Auswertung konnten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Bandscheiben und Schafen festgestellt werden. Selbst bei den *intakten* Bandscheiben wurden im Anulus fibrosus Verfärbungen und strukturelle Veränderungen gefunden.

Zum Zeitpunkt von 7 Wochen liessen sich bezüglich des allgemeinen makroskopischen Bildes wenig Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen feststellen, danach stieg der Score aller Gruppen ausser

jener der *intakten* Bandscheiben an. Den höchsten Wert von 8.83 erreichen die mit *Albugel plus Zellen* behandelten Bandscheiben nach 15 Wochen.

Betrachtet man die einzelnen Beurteilungskriterien, zeigte sich, dass bei den 7- und 15-Wochen Gruppen von *Albugel* und *Albugel plus Zellen* insbesondere die Struktur des Anulus und die Farbe der Bandscheiben stärker verändert waren (*Diagramme 1-5, Tabelle 10*).

### 4.5 Magnetresonanztomographische Auswertung

Die MRI-Aufnahmen der Schafe 13.09 und 13.14 konnten aufgrund mangelnder Bildqualität nicht nach dem Pfirrmann-Grading beurteilt werden. Drei Bandscheiben konnten nicht ausgemessen werden, da sie zu starke Veränderungen an den angrenzenden Wirbelkörpern und Endplatten aufwiesen (13.04 L2/3, 13.12 L3/4, 13.18 L3/4).

#### 4.5.1 Pfirrmann-Grading

Die Beurteilung von Struktur, Abgrenzbarkeit, Signalintensität und Bandscheibenraumhöhe nach Pfirrmann (3.7.2, *Tabelle 3*) zeigte, dass alle untersuchten Bandscheiben bereits einem Degenerationsprozess unterlagen. Die Mittelwerte der Behandlungsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten reichten von 2.5 bis 3.2, was einer Bandscheibendegeneration von Grad II bzw. III nach Pfirrmann entspricht. Die *intakten* Bandscheiben lagen mit Werten von 2.67, 2.8 und 3.2 nach 7, 11 bzw. 15 Wochen in einem vergleichbaren Bereich wie die in der ersten Operation geschädigten Bandscheiben. Signifikante Unterschiede oder Trends bezüglich der verschiedenen Gruppen konnten nicht gefunden werden (*Tabelle 11, Diagramme 6, 7*).

#### **4.5.2 Absolute Bandscheibenhöhe**

Die Mittelwerte der Abstände zwischen den aufeinanderfolgenden Endplatten betrugen zwischen 3.95 mm (*Albugel plus Zellen*, 15 Wochen) und 4.61 mm (*Albugel plus Zellen*, 11 Wochen). Es konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen und Zeitpunkten festgestellt werden (*Tabelle 11, Diagramm 8*).

#### **4.5.3 Winkel angrenzende Wirbelkörper**

Die Winkelmessung zwischen den Endplatten aufeinanderfolgender Lendenwirbel ergab nur geringe Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Sowohl die kleinsten als auch die grössten Winkel wiesen die an die *intakten* Bandscheiben grenzenden Endplatten auf. Zum Zeitpunkt von 11 Wochen konnte in dieser Gruppe ein Mittelwert von 5.6° ermittelt werden, bei 7 Wochen waren es 8.6°. Es zeigte sich kein erkennbares Muster zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen und Zeitpunkten, die individuellen Unterschiede waren jedoch relativ gross, was auch die hohen Standardabweichungen zeigen (*Tabelle 11, Diagramm 9*).

## 4.6 Histologische Auswertung

Es wurden 66 Bandscheiben vollständig histologisch ausgewertet. Sechs Präparate gingen ganz oder teilweise nicht in die histologische Beurteilung ein (*Tabelle 9*), da die Qualität ungenügend war oder die Bandscheibe so stark degeneriert war, dass keine morphologischen Kriterien mehr beurteilt werden konnten.

Schaf Nr.	Bandscheibe	Behandlung	Färbungen	Zonen	Grund
13.05	L 1/2	Geschädigt	AB-PAS	1	mangelhafte Qualität des Präparates
			PR	1	
13.12	L 3/4	Albugel	alle	alle	hgr. Degeneration
	L 4/5	Albugel+Zellen	AB-PAS	3	mangelhafte Qualität des Präparates
13.15	L 2/3	Albugel	HE	alle	mangelhafte Qualität des Präparates
			AB-PAS	1, 2	
			PR	2	
			Koll II	1, 2	
13.16	L 4/5	Geschädigt	HE	alle	mangelhafte Qualität des Präparates
13.18	L 3/4	Intakt	alle	alle	hgr. Degeneration

*Tabelle 9: Nicht oder nur teilweise auswertbare histologische Präparate*

### 4.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die mit HE gefärbten Präparate wurden anhand eines Scoringsystems hinsichtlich der Zelldichte und der Anzahl und Grösse von Chondrozytenclustern im Nucleus bewertet (*siehe 3.7.3*)

#### 4.6.1.1 Zelldichte

Bei der Zelldichte im Nucleus zeigte sich ein relativ homogenes Bild zwischen den Behandlungsgruppen. Allgemein war ein leichter Trend zur Verminderung der Zelldichte bei 15 Wochen zu sehen. Bei den mit *Albugel* behandelten Bandscheiben sank die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt sogar auf einen Score von 2.8 ab, im Vergleich zu 3.6 bei den *geschädigten* Bandscheiben bzw. 3.8 bei den

*intakten* und *Albugel plus Zellen*. Nachdem sie zum Zeitpunkt von 7 Wochen eine leicht höhere Zelldichte als die *intakten* Bandscheiben aufgewiesen hatten, verhielten sich die mit *Albugel plus Zellen* behandelten Bandscheiben bei 11 und 15 Wochen am ähnlichsten wie diese. Die *intakten* Bandscheiben wiesen die über den Zeitverlauf konstantesten Werte auf (*Tabelle 12, Diagramm 10*).

#### 4.6.1.2 Chondrozytencluster

Zwischen der Abnahme der Zelldichte und der Abnahme von Anzahl und Grösse bei 15 Wochen ergab sich eine statistisch signifikante Korrelation. Die durchschnittliche Anzahl Zellen pro Cluster bewegte sich bei allen Gruppen zwischen zwei und sechs. Am konstantesten über den Beobachtungszeitraum verhielten sich die *intakten* Bandscheiben. Auffällig war der gegenläufige Trend zu grossen Clustern bei der mit *Albugel plus Zellen* behandelten Gruppe zum Zeitpunkt von 15 Wochen; hier wurden bei zwei von sechs Präparaten Cluster von mehr als sieben Zellen gefunden (*Tabelle 12, Diagramme 11, 12*).

#### 4.6.2 Alcianblau-Periodic-Acid-Schiffs-Färbung

In der AB-PAS-Färbung waren in den Zonen 2 und 3 nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich des Gehalts an blau angefärbten sauren und purpurn angefärbten neutralen Glykosaminoglykanen sichtbar (*siehe 3.7.3*). Die mit *Albugel plus Zellen* behandelten Bandscheiben verhielten sich bezüglich des Gehaltes an neutralen GAG am ähnlichsten wie die *intakten*. Den höchsten Anteil saurer GAG erreichten die mit *Albugel* behandelten Bandscheiben zum Zeitpunkt von 11 Wochen (Score 2.90). Zugleich zeigte sich hier der niedrigste Gehalt an neutralen GAG (Score 0.80). Umgekehrt wurde der grösste Flächenanteil von sauren (Score 2.33) und der kleinste von neutralen GAG (Score 1.58) bei den *intakten* Bandscheiben zum Zeitpunkt von 15 Wochen gefunden. Dieses gegenläufige Vorkommen von sauren und neutralen

Glykosaminoglykanen zeigte sich allgemein in einer statistisch signifikanten negativen Korrelation der jeweiligen Flächenanteile im Nucleus und im inneren Anulus (*Tabelle 12, Diagramme 13, 14*)

### 4.6.3 Pikrosiriusrot-Färbung

In der Pikrosiriusrot-Färbung zeigte sich eine gleichmässige Verteilung von granulären Veränderungen in Nucleus und innerem Anulus aller Behandlungsgruppen (*siehe 3.7.3*). Am häufigsten betroffen waren die *geschädigten, unbehandelten* Bandscheiben zum Zeitpunkt von 11 Wochen, hier zeigten drei von sechs untersuchten Präparaten granuläre Veränderungen. Das Auftreten granulärer Veränderungen blieb über die Zeit mit Scoringwerten von 2.5 bis 3 relativ konstant, während die flächenmässige Ausdehnung tendenziell leicht zunahm. Vor allem bei den mit *Albugel* behandelten Bandscheiben ist der Anstieg deutlich, während die 7-Wochen-Präparate den tiefsten Wert aller Proben aufwies (Score 1.17), ergaben sich bei 11 und 15 Wochen mit 2.1 und 2.0 die jeweils höchsten Scores der jeweiligen Zeitpunkte (*Tabelle 12, Diagramme 15, 16*).

## 4.7 Immunhistochemische Auswertung

### 4.7.1 Aggrecan

Die Auswertung in den Zonen 2 und 3 (*siehe 3.7.4*) ergab eine weitgehend ausgeglichene Aggrecanverteilung bezüglich der Behandlungsgruppen. Auch im Zeitverlauf verhielt sich der Gehalt relativ konstant, einzig bei 11 Wochen zeigte sich ein leichter Trend zu erhöhter Aggrecandeposition. So stieg der Score bei den *intakten* Bandscheiben von 4.10 bei 7 Wochen auf 5.16 an, bei den mit *Albugel plus Zellen* behandelten von 3.75 auf 5.08. Auffällig war das vermehrte Vorkommen von Aggrecan im Bereich von Chondrozytenclustern (*Tabelle 13, Diagramm 17*).



#### 4.7.2 Kollagen I

Die Kollagen I-Verteilung wurde nur im Nucleus ausgewertet (*siehe 3.7.4*). Bei den *intakten* Bandscheiben zeigte sich, dass in dieser Region kaum Kollagen I vorhanden war. Die *geschädigten* Bandscheiben zeigten anfangs die höchste Deposition mit einem Wert von 2.33, der sich dann nach 11 Wochen verringerte (Score 1.33) und nach 15 Wochen weiter abnahm (Score 0.67). Die mit *Albugel* behandelten Bandscheiben wiesen bei 11 Wochen mit einem Wert von 2.0 den höchsten Kollagen I – Gehalt im Beobachtungszeitraum auf, während die Gruppe *Albugel plus Zellen* über die Zeit einen Anstieg des Kollagen I im Nucleus zeigte. Die Mittelwerte aller Gruppen wiesen hohe Standardabweichungen auf (*Tabelle 13, Diagramm 18*).

#### 4.7.3 Kollagen II

Kollagen II wies eine konstante Verteilung über die Behandlungsgruppen und Zeitpunkte auf. Die Scoringwerte (*siehe 3.7.4*) reichen von 3.92 (*Geschädigt 15 Wochen*) bis 4.92 (*Intakt 11 Wochen, Albugel plus Zellen 11 Wochen*). Die Kollagen II – Deposition in Nucleus und äusserem Anulus korrelierte signifikant negativ mit der Kollagen I – Verteilung im Nucleus. Wie schon bei Aggrecan konnte auch bei Kollagen II eine erhöhte Konzentration um die Chondrozytencluster beobachtet werden (*Tabelle 13, Diagramm 19*).

### 4.8 Biochemische Auswertung

#### 4.8.1 Kollagengehalt

Bei allen Behandlungsgruppen zeichnete sich ein Trend zu steigendem Kollagengehalt über die Zeit ab. Besonders stark zeigte sich dies bei den *geschädigten, unbehandelten* Bandscheiben, bei denen der durchschnittliche Gehalt von 21.43 mg/100mg zum Zeitpunkt von 7 Wochen nach 15 Wochen auf mehr als das Doppelte anstieg (48.96mg/100mg). Dieser Höchstwert

unterscheidet sich statistisch signifikant im Vergleich zu den durchschnittlichen Kollagengehalten der Gruppen *Intakt*, *Geschädigt* und *Albugel plus Zellen* bei 7 Wochen (*Tabelle 14, Diagramm 20*).

### 4.8.2 DNA-Gehalt

Zwischen 7 und 11 Wochen zeigte der durchschnittliche DNA-Gehalt der Bandscheiben bei allen Behandlungsgruppen eine steigende Tendenz. Nachdem *Albugel* bei 11 Wochen den höchsten DNA-Gehalt von  $0.1026\mu\text{g}/\text{mg}$  aufwies, sank dieser in der 15 Wochen-Gruppe wieder auf  $0.0955\mu\text{g}/\text{mg}$  ab. Bei den anderen Behandlungsgruppen setzte sich der Aufwärtstrend fort. Der höchste DNA-Gehalt aller Gruppen von  $0.1100\mu\text{g}/\text{mg}$  wurde bei den *geschädigten* Bandscheiben ohne Behandlung zum Zeitpunkt von 15 Wochen ermittelt. Die DNA-Gehalte der mit *Albugel plus Zellen* behandelten Bandscheiben kamen, über alle drei Zeitpunkte gesehen, denen der *intakten* am nächsten (*Tabelle 14, Diagramm 21*).

### 4.8.3 Glykosaminoglykangehalt

Bei der Auswertung der Glykosaminoglykangehalte in den Bandscheiben ergaben sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Am meisten Glykosaminoglykan wurde bei allen Gruppen zum Zeitpunkt von 15 Wochen gemessen, dabei erreichten die *geschädigten, unbehandelten* den höchsten Wert von  $117.18\mu\text{g}/\text{mg}$ . Die niedrigsten Glykosaminoglykangehalte wies *Albugel plus Zellen* mit  $81.38\mu\text{g}/\text{mg}$  nach 7 Wochen und  $73.96\mu\text{g}/\text{mg}$  nach 11 Wochen auf (*Tabelle 14, Diagramm 22*).

## 4.9 Genexpression

### 4.9.1 Kollagen I A2

Bei der Genexpressionsanalyse (*siehe 3.6.6 und 3.7.6*) von Kollagen I A2 zeigten die *intakten* Bandscheiben relativ konstante tiefe Werte von 0.114, 0.043 und 0.047 nach 7, 11 bzw. 15 Wochen. Die Genexpression bei den anderen Behandlungsgruppen wies eine sehr grosse Streuung ohne erkennbares Muster auf. Die mit *Albugel* behandelten Bandscheiben erreichten zum Zeitpunkt von 11 Wochen mit 0.442 die höchste Expression aller Gruppen. Die hohe dazugehörige Standardabweichung 0.502 zeigt, dass die Ergebnisse der sechs Bandscheiben dieser Gruppe stark gestreut waren (*Tabelle 15, Diagramm 23*).

### 4.9.2 Kollagen II A1

Kollagen II A1 wurde in allen Gruppen rund 100x stärker exprimiert als Kollagen I A2. Die durchschnittliche Genexpression reichte von 3.235 bei *Albugel plus Zellen* 15 Wochen bis zu 21.2716 bei *Albugel* 11 Wochen. Die tiefste Expression wiesen alle Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt von 15 Wochen auf. Es zeigte sich eine sehr grosse individuelle Varianz und somit hohe Standardabweichungen (*Tabelle 15, Diagramm 24*).

### 4.9.3 Kollagen X

Die mRNA von Kollagen X wurde bei allen Gruppen nur auf tiefem Niveau exprimiert. Die Werte reichten von 0.030 (*Geschädigt* 7 Wochen) bis 0.134 (*Albugel plus Zellen* 15 Wochen) und wiesen eine breite Streuung auf (*Tabelle 15, Diagramm 25*).

#### 4.9.4 Aggrecan

Die Expression von Aggrecan-mRNA wies bei allen Behandlungstypen eine abnehmende Tendenz über den beobachteten Zeitraum auf. Nach 7 und nach 15 Wochen zeigte sich ein ähnliches Bild mit der höchsten Expression bei den *intakten* (1.304 bzw. 0.682) und der tiefsten bei den mit *Albugel plus Zellen* behandelten Bandscheiben (0.711 bzw. 0.270). Zum Zeitpunkt von 11 Wochen unterschied sich die Aggrecan-Expression der verschiedenen Behandlungsgruppen kaum voneinander. Alle Werte zeigten hohe Standardabweichungen (*Tabelle 15, Diagramm 26*)

#### 4.9.5 Hyaluronansynthase 2 und 3

Die Expression von HAS2-mRNA war etwa 5mal höher als diejenige von HAS3, das Verhältnis zwischen den beiden Werten blieb bei allen Gruppen relativ konstant. Die jeweiligen Maximalwerte, 1.018 für HAS2 und 0.310 für HAS3, wurden in der *Albugel*-Gruppe zum Zeitpunkt von 15 Wochen gemessen. Allerdings deuten die sehr hohen Standardabweichungen auf eine breite Streuung hin. Die anderen Behandlungsgruppen wiesen relativ einheitliche Messdaten auf. Sie bewegen sich bei HAS2 zwischen 0.037 (*Geschädigt* 7 Wochen) und 0.411 (*Albugel plus Zellen* 15 Wochen) sowie zwischen 0.024 (*Geschädigt* 7 Wochen) und 0.145 (*Albugel plus Zellen* 15 Wochen) bei HAS3 (*Tabelle 16, Diagramme 27, 28*).

#### 4.9.6 Alkalische Phosphatase

Die Genexpressionsanalyse der AP-mRNA ergab für alle Behandlungsgruppen und Zeiten konstant tiefe Ergebnisse an der Nachweisgrenze für diese Methode. Die Expressionswerte bewegen sich zwischen 0.000087 (*Albugel plus Zellen* 7 Wochen) und 0.002435 (*Geschädigt* 15 Wochen). Nur die mit *Albugel* behandelten Bandscheiben zeigten bei 15 Wochen eine deutlich höhere

Expression von 0.006263. Die Standardabweichung ist mit 0.014569 jedoch mehr als doppelt so gross wie der eigentliche Wert (*Tabelle 16, Diagramm 29*).

#### **4.9.7 Lubricin**

Bei der Untersuchung der Lubricinexpression liess sich kein Muster bezüglich der unterschiedlichen Behandlungen und Zeitpunkte erkennen. Die höchste Ausprägung zeigte *Albugel* nach 11 Wochen (0.9926), am geringsten wurde Lubricin bei den *intakten* Bandscheiben zu den Zeitpunkten von 11 und 15 Wochen (0.3713 bzw. 0.3955) exprimiert. Auch hier zeigt sich allgemein eine grosse Streuung der Ergebnisse (*Tabelle 16, Diagramm 30*).

#### **4.9.8 Interleukin-1**

Die Genexpression von Interleukin-1 blieb in den *intakten* Bandscheiben über den gesamten Zeitraum konstant niedrig, während sie bei den anderen Gruppen, insbesondere bei *Albugel* und *Albugel plus Zellen* bei 15 Wochen anstieg. Die höchste Expression (0.2248) erreichten die mit *Albugel* behandelten Bandscheiben bei 15 Wochen. Allgemein zeigten auch die hohen Standardabweichungen, dass die einzelnen Werte stark gestreut waren (*Tabelle 16, Diagramm 31*).

## 5 Diskussion

In dieser Studie sollte der Einfluss von in *Albugel* eingebetteten Bandscheiben-Chondrozyten auf die Heilung von vorgeschädigten lumbalen Bandscheiben untersucht werden. Verschiedene Analysen von bandscheibentypischen Merkmalen und Degenerationsmarkern sollten die Wirkung sowie die Sicherheit der Applikation von *Albugel* und *Albugel plus Zellen* innerhalb der Bandscheibe zu drei verschiedenen Zeitpunkten zeigen. Als Vergleich dienten *intakte* sowie *geschädigte, unbehandelte* Nachbarbandscheiben.

Die Anästhesien für die Operationen wurden von allen 21 Versuchstieren problemlos vertragen. Bei zwei Tieren war unmittelbar nach dem Eingriff eine leichte Hinterhandschwäche erkennbar. Wahrscheinlich wurde sie von der Überstreckung der Hüft-, Knie- und Sprunggelenke während der Lagerung auf dem Operationstisch verursacht. Die Schwäche normalisierte sich jeweils innert der ersten Stunden nach der Operation. Das Schaf 13.07 zeigte nach der Implantations-Operation eine Parese der rechten Hinterhand mit fehlender Propriozeption. Es konnte nicht eindeutig eruiert werden, ob dies von der Lagerung während der Operation herrührte oder vom Druck des Hämatoms, welches sich nach dem Eingriff im Operationsgebiet bildete. Die Tatsache, dass die Propriozeption im betroffenen Bein nach vier Tagen wieder vorhanden war, spricht eher für eine lagerungsbedingte Ursache, da der Abbau des Hämatoms vermutlich länger gedauert hätte.

Bei den Schafen 13.01, 13.02, 13.03, 13.05, 13.10 und 13.20 kam es während eines der chirurgischen Eingriffe zu stärkeren Blutungen aufgrund von Gefäßrupturen. Nur bei 13.10 hatte dieser Blutverlust auch Einfluss auf den klinischen Allgemeinzustand in der postoperativen Phase. Es ist bekannt, dass eine ungenügende Blutversorgung der Bandscheiben degenerative Prozesse begünstigen kann [15, 16]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bandscheibenheilung bei den oben genannten Schafen durch die rupturierten

Gefässe im Operationsgebiet beeinträchtigt wurde. Da die betroffenen Tiere aber bei den Untersuchungsergebnissen keine deutlichen Abweichungen aufwiesen, war dies wahrscheinlich nicht der Fall.

Die 39 chirurgischen Eingriffe konnten wie geplant durchgeführt werden. Aufgrund der engen anatomischen Verhältnisse beim Schaf war es bei der Schädigungsoperation nicht immer einfach, die Biopsiestanze in die Bandscheiben einzuführen. Auch bei der Injektion der therapeutischen Substanzen machte sich diese Enge bemerkbar. Bei einigen Tieren war es nur schwer möglich, den Inhalt der Doppelkammerspritze zu applizieren, wenngleich immer die geforderte Mindestmenge von 0.5ml in die Bandscheibe eingebracht werden konnte. Für eine Anwendung der Methode in der Humanmedizin dürften diese Probleme jedoch wenig relevant sein, da Bandscheibenhöhe und -volumen beim Menschen deutlich grösser sind [90].

Auch die genaue Identifikation der einzelnen Lendenwirbel und somit die Lokalisation der jeweiligen Bandscheibe war anspruchsvoll, da die Schafe teilweise über ausgeprägte Rückenmuskeln und viel subkutanes Fett verfügten. Deswegen wurde bei 16 der 18 Empfängerschafe auf die minimalinvasive Applikation von *Albugel* (mit oder ohne Zellen) verzichtet und stattdessen ein offener chirurgischer Eingriff durchgeführt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass der Spritzeninhalt in die richtige Bandscheibe injiziert wird. Trotzdem kam es bei Schaf 13.12 zu einer Applikation von *Albugel plus Zellen* in die falsche Bandscheibe. Eine vollständige Sicherheit der korrekten Orientierung kann also auch der offene Eingriff nicht geben. Idealerweise sollte deswegen die Lokalisation der Kanüle vor der Injektion immer mittels C-Bogen-Darstellung überprüft werden.

Die offene Chirurgie bedingte ein deutlich grösseres Weichteiltrauma, womit entzündliche Vorgänge und eine veränderte Belastung des Rückens einhergehen können. Dies wiederum könnte einen negativen Einfluss auf die

Heilung der Bandscheiben haben. Für die Anwendung in der Humanmedizin sollte diese Frage jedoch kaum eine Rolle spielen, da die anatomischen Verhältnisse beim Menschen eine problemlose perkutane Applikation zulassen [25].

Die Polymerisation von *Albugel* wurde vor jeder Injektion ausserhalb des Tierkörpers auf einer Folie kontrolliert. Bei allen Operationen konnte eine erfolgreiche Vernetzung der beiden *Albugel*-Komponenten beobachtet werden. In den histologischen Präparaten wurden keine Rückstände des Hydrogels gefunden und vor allem keine Hinweise auf Fremdkörperreaktionen innerhalb der Bandscheiben beobachtet. Die antiangiogenetische Wirkung von *Albugel* sowie sein suppressiver Effekt auf Knochen- und Endothelzellen wurden in dieser Studie nicht untersucht, waren aber in einer früheren Studie bereits dokumentiert worden.

Die Lendenwirbelsäulen aller Empfängerschafe wurden direkt nach deren Schlachtung im MRI untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen waren nicht sehr aussagekräftig. In allen Bandscheiben, auch in jenen ausserhalb des für den Versuch ausgewerteten Bereichs L1-L5, zeigten sich bereits degenerative Veränderungen von Pfirrmann Grad II und III.

Im Bezug auf die Fragestellung der Studie hält sich der Erkenntnisgewinn mit MRI somit in Grenzen, insbesondere, weil keine Vergleichswerte vorliegen, wie der Zustand der Bandscheiben vor der Schädigung bzw. vor der Therapie war. Für eine nächste Studie wäre also eine MRI-Untersuchung zum Versuchsbeginn zu empfehlen, um später allfällige Veränderungen über die Zeit jeder einzelnen Bandscheibe beurteilen zu können. Damit könnten auch Tiere mit präexperimentellen Schäden an der Wirbelsäule erkannt und von der Studie ausgeschlossen werden.



Grundsätzlich ist es aber fraglich, ob die feinen Variationen auf molekularer und zellulärer Ebene mit diesem Instrument überhaupt sichtbar gemacht werden können. In der 2011 durchgeführten *Albugel*-Studie brachten die insgesamt sieben MRI-Untersuchungen pro Schaf im Untersuchungsverlauf wenig relevante Erkenntnisse. Allerdings wurden diese Untersuchungen mit einem anderen MRI-Gerät durchgeführt. Es konnten einzig geringe Reduktionen der Signalintensität nach zwei und vier Wochen gezeigt werden, die sich nach 3 Monaten jedoch wieder normalisierten [62].

Zwei der 18 MRI konnten aufgrund mangelnder Bildqualität nicht nach Pfirrmann ausgewertet werden. Wahrscheinlich hatten diese beiden Präparate nach dem Tod der Tiere zu viel Wärme verloren. Wegen einer möglichen Beeinflussung der biochemischen Parameter wurden die Wirbelsäulen nach der Schlachtung nicht warmgehalten. Die optimale Qualität der magnetresonanztomographischen Aufnahmen hängt jedoch stark von der gleichmässigen Temperatur des zu untersuchenden Objekts ab. Die Untersuchung von Teilen eines Schlachtkörpers sollte demnach möglichst unmittelbar nach dem Tod des Tieres erfolgen.

Die Vermessungen des Bandscheibenraums und der Winkel zwischen den Endplatten waren ein Versuch, weitere aufschlussreiche Daten zu generieren.

Bezüglich der Bandscheibenhöhe ergaben sich kaum nennenswerte Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Beim Endplattenwinkel, welcher von der Form der Bandscheibe bestimmt wird, stellt sich die Frage, ob dieser post mortem am ausgesägten Wirbelsäulenpräparat mit jenem intra vitam vergleichbar ist. Hierfür müssten weitere Messungen mit Schafen angestellt werden, welche unmittelbar vor und nach dem Tod magnetresonanztomographisch untersucht werden.

Drei Bandscheiben konnten aufgrund schwerwiegender morphologischer Veränderungen nicht vermessen werden (13.04 L2/3, 13.12 L3/4, 13.18 L3/4). Bei 13.12 und 13.18 zeigten sich auch bei der histologischen Untersuchung in der

jeweiligen Bandscheibe hochgradige degenerative Veränderungen mit massiver Infiltration von Entzündungszellen. Diese Läsionen könnten während einer der Operationen entstanden sein oder auch bereits vor dem Versuch, zum Beispiel durch einen Sturz oder unsachgemässes Umsetzen. Keines der Tiere zeigte während des Beobachtungszeitraums klinische Auffälligkeiten.

Für die Erstellung der Fotos zur makroskopischen Beurteilung wurden die halbierten Bandscheiben parallel zu den Endplatten aufgeschnitten. Dies ermöglichte eine grossflächige makroskopische Beurteilung der Bandscheibenstruktur und -farbe. Bei der häufig verwendeten makroskopischen Bewertung nach Thompson [115] wird normalerweise der gesamte zu untersuchende Wirbelsäulenabschnitt in der Medianen aufgesägt. Bei dieser Schnittebene kann zwar die Bandscheibe an sich nur auf einem kleineren Abschnitt eingesehen werden, sie erlaubt aber zusätzlich eine Beurteilung der Endplatten. Da in der vorliegenden Studie das Hauptinteresse auf dem Bandscheibengewebe lag, hat sich die gewählte Schnitttechnik bewährt.

Bei der makroskopischen Untersuchung der Bandscheiben zeigte sich, dass die Schäden im Anulus bei den in der zweiten Operation behandelten Bandscheiben am grössten waren. Selbst die *geschädigten*, aber unbehandelten Bandscheiben wiesen in diesem Punkt weniger starke Veränderungen auf. Der Grund für diese Unterschiede könnte in der zweiten Operation liegen, bei der insbesondere der Anulus fibrosus erneut traumatisiert wurde.

Die Proben für die histologische Auswertung wurden in Paraffin eingebettet. Das war notwendig, um neben den konventionellen Färbungen auch immunhistochemische anwenden zu können. Das Schneiden der Paraffinpräparate gestaltete sich jedoch, aufgrund der unterschiedlichen Konsistenzen von Bandscheibe und angrenzendem Knochen, äusserst

schwierig. Folge davon waren viele Artefakte in den Schnitten wie Risse oder Falten, welche die Auswertbarkeit teilweise einschränkten.

Werden Bandscheiben in Polymethylacrylate (PMMA) eingebettet, ist aufgrund der höheren Stabilisierung mit einer sehr viel geringeren Artefaktbildung zu rechnen. Allerdings können diese Präparate dann nicht immunhistochemisch gefärbt werden. Bei einer nächsten Studie müsste man sich also überlegen, ob durch die Beurteilung der nativen Struktur nicht vielleicht mehr Erkenntnisse über den Zustand der Bandscheibe gewonnen werden könnten, als durch die Immunhistochemie. Oder man müsste mehr Tiere verwenden um jeweils separat die Morphologie, wie auch die Immunhistochemie, bzw. die biochemischen Parameter zu bestimmen. Vor allem in Bezug auf die Morphologie wäre es auch wünschenswert die Bandscheibe als Ganzes und intakt in PMMA einzubetten. Durch das Zerschneiden der Bandscheiben wurde der Nucleusteil stark vorgewölbt, was ebenfalls für Artefakte verantwortlich sein kann. Nichts desto trotz war es trotz den etwas erschwerten Bedingungen möglich die verschiedenen histologischen Parameter zu erheben und Aussagen dazu formulieren zu können.

Um einen Eindruck der Zelldichte in den Bandscheiben zu bekommen, wurde jeweils in den Präparaten der HE-Färbung die Zellularität im Nucleus bewertet und in den rechten Bandscheibenhälften der DNA-Gehalt bestimmt.

Beide Untersuchungen ergaben ein relativ ausgeglichenes Bild zwischen den Behandlungsgruppen. Bei der histologischen Auswertung blieb die Zelldichte auch über die Zeit konstant, während bei der biochemischen Auswertung ein Trend zu höheren Zellzahlen nach 11 bzw. 15 Wochen erkennbar war. Da sich die histologische Untersuchung auf den Nucleus beschränkt, die DNA-Messung aber auch den Anulus mit einbezog, könnte dies auf eine steigende Zellzahl vor allem im Anulus hinweisen.

Auffällig ist, dass die mit *Albugel plus Zellen* behandelten Bandscheiben, was ihren zellulären Zustand angeht, den *intakten* am ähnlichsten sind. Es zeigte sich sowohl histologisch als auch biochemisch ein durchgehender, wenn auch nicht statistisch signifikanter Unterschied zu den Bandscheiben, bei denen nur *Albugel* alleine injiziert worden war. Man kann also vermuten, dass sich hier ein Effekt der implantierten Zellen zeigt. Allerdings sind, wie bei vielen der hier ermittelten Ergebnisse, die Standardabweichungen sehr hoch, was auf eine breite Streuung aufgrund interindividueller Unterschiede hinweist und eine klare Interpretation der Resultate erschwert. In der letzten *Albugel*-Studie wurden nach einer Überlebenszeit von 6 Monaten 2-3-fach höhere DNA-Gehalte gemessen als in der vorliegenden Studie nach 3 Monaten [62].

In der Literatur wird die Entwicklung der Zellzahl innerhalb der Bandscheibe im Laufe des Degenerationsprozesses kontrovers diskutiert. Teilweise zeigte sich in den Untersuchungen eine Reduktion der Zelldichte [23], andere Autoren fanden jedoch eine Erhöhung der Zellzahl mit fortschreitender Degeneration [21, 22].

Über die Art und Funktionsfähigkeit der Zellen geben diese Analysen nur wenig Auskunft. Es könnte sich also theoretisch auch um inaktive Bandscheiben-Chondrozyten, Fibrozyten oder Entzündungszellen handeln. Bei der Betrachtung der histologischen Schnitte waren aber keine Entzündungszellen sichtbar, ausser bei den bereits erwähnten Bandscheiben 13.12 L3/4 und 13.18 L3/4. Auch die Genexpression von Interleukin-1 als Marker für Entzündungsprozesse bewegte sich anfangs auf sehr tiefem Niveau, stieg dann aber, vor allem bei den behandelten Bandscheiben, nach 15 Wochen an. Ein Vergleich mit der vorangehenden *Albugel*-Studie zeigt, dass die mRNA-Konzentration von Interleukin-1 nach 6 Monaten zwar wieder sank, aber selbst in den *intakten* Bandscheiben der Versuchstiere immer noch höher war als jene in Bandscheiben von gesunden Kontrollschafen [62].

Die Funktionsfähigkeit der Zellen zeigt sich anhand ihrer bandscheibentypischen Matrixproduktion [25, 26], die hier histologisch, immunhistochemisch, biochemisch und mittels Genexpressionsanalyse untersucht wurde. Ein wichtiger Matrixbestandteil für die Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks ist Aggrecan [3]. Die Untersuchung der Aggrecan-mRNA zeigte eine abnehmende Tendenz über die Zeit, während die Aggrecandeposition in den immunhistologischen Präparaten annähernd konstant blieb. Klare Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren nicht ersichtlich, die interindividuelle Varianz war jedoch, insbesondere bei der PCR-Analyse, sehr gross. Eine eindeutige Abnahme der Aggrecankonzentration, was als Degenerationszeichen gewertet wird [25, 26], war in den Resultaten nicht ersichtlich. Der Glykosaminoglykangehalt insgesamt wies zwar geringe Schwankungen auf, zeigte aber keine klaren Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen und Zeitpunkten. Auch bei der Studie von Benz et al. fanden sich nach 6 Monaten kaum Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Ausserdem waren die Glykosaminoglykangehalte der behandelten Bandscheiben praktisch identisch mit jenen in Kontrollbandscheiben gesunder Schafe [62]. Dies steht im Widerspruch zu einer Studie, bei welcher die Bandscheiben chemisch mit Bromdesoxyuridin geschädigt wurden und der Glykosaminoglykangehalt in der Folge innert 14 Wochen um 30-50% sank [107].

In der AB-PAS-Färbung wurde die Verteilung von langen, sauren und kurzen, neutralen Glykosaminoglykanen bestimmt. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren sehr gering und es zeichnete sich kein erkennbares Muster ab. Es zeigte sich einzig eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen den jeweiligen Flächenanteilen von sauren und neutralen Glykosaminoglykanen.

Der Gesamtkollagengehalt wies eine über die Zeit steigende Tendenz auf. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren gering und variierten

je nach Zeitpunkt. Da die Genexpression von Kollagen II rund 100x höher war als jene von Kollagen I kann angenommen werden, dass sich der in der biochemischen Untersuchung gemessene Gesamtkollagengehalt primär auf Kollagen II bezieht. Der mittlere Kollagengehalt zum Zeitpunkt von 15 Wochen ist mit jenem aus der 6-Monats-Studie vergleichbar [62]. Auch da gab es kaum Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Den höchsten Mittelwert wies, wie in vorliegenden Experiment, die Gruppe der *geschädigten, unbehandelten* Bandscheiben auf [62]. Der histologisch bestimmte Kollagen II-Gehalt in Nucleus und innerem Anulus blieb über den Beobachtungszeitraum relativ konstant, während die Genexpression von Kollagen II nach 15 Wochen die tiefsten Werte zeigte. Dies lässt vermuten dass eine allfällige reaktive Erhöhung der Kollagen II-Synthese zu diesem Zeitpunkt beendet ist.

Auch die konstante Genexpression der Hyaluronansynthase Isoenzyme 2 und 3 spricht für Funktionalität der vorhandenen Bandscheiben-Chondrozyten. Die maximalen Werte erreichten jeweils die mit *Albugel* allein behandelten Bandscheiben zum Zeitpunkt von 15 Wochen. Allerdings erschweren die hohen Standardabweichungen eine Deutung dieser beiden Werte.

Bei der Genexpression von Lubricin zeigte sich eine grosse Streuung der einzelnen Messergebnisse. Klare Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen und Zeitpunkten sind keine zu finden. Allgemein liegen die in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse geringgradig über den Werten, die in der letzten *Albugel*-Studie bei den gesunden Kontrolltieren gemessen wurden, und sind tiefer als diejenigen der operierten Tiere nach 6 Monaten [62]. Dies lässt darauf schliessen, dass sich die Lubricinexpression der in dieser Studie untersuchten Bandscheiben im physiologischen Bereich bewegt.

Neben den Untersuchungen von Anzahl und Funktionsfähigkeit der Zellen in den Bandscheiben, wurde auch das Vorkommen von Degenerationszeichen

analysiert. Hierfür wurde unter anderem in den immunhistochemischen Präparaten die Kollagen I-Verteilung im Nucleus pulposus bestimmt. Kollagen I kommt in der gesunden Bandscheibe primär im Anulus fibrosus vor, eine erhöhte Konzentration im Nucleus weist auf fibrotische Prozesse hin [27]. Wie erwartet war in den Nuclei der *intakten* Bandscheiben kaum Kollagen I zu finden. Auch bei der Genexpressionsanalyse von Kollagen I in der jeweils linken Bandscheibenhälfte wies diese Gruppe die tiefsten Werte auf. Bei den in der 1. Operation geschädigten Bandscheiben zeigten sich wiederum grosse individuelle Unterschiede innerhalb der Gruppen. In den *geschädigten, unbehandelten* Bandscheiben konnte nach 7 Wochen am meisten Kollagen I nachgewiesen werden, danach wurden sie von den behandelten überholt. Diese Entwicklung könnte wiederum damit zusammenhängen, dass bei den behandelten Bandscheiben die Umbauprozesse des Gewebes aufgrund des Traumas in der zweiten Operation noch im Gange waren.

Die Matrixdegeneration, sichtbar als granuläre Veränderungen bei den mit HE- und PR-gefärbten Histologiepräparaten, kam in allen Gruppen und zu allen Zeitpunkten praktisch gleich häufig vor. Es zeigte sich aber, dass sich die degenerativen Veränderungen flächenmässig von 7 bis 11 bzw. 15 Wochen leicht ausdehnten.

Die Bildung von Zellclustern im Nucleus wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren sehen sie als primär degenerativen Prozess [19], andere als eine anabole Antwort auf veränderte Umweltbedingungen, welche mit einer allgemeinen Zellproliferation in Verbindung steht [20, 21]. Auch im vorliegenden Versuch bestätigt sich dieser Zusammenhang, hier in umgekehrter Richtung: Der allgemeine Trend zur Abnahme der Zelldichte über die Zeit zeigt eine statistisch signifikante Korrelation mit weniger und kleineren Chondrozytenclustern im Nucleus. Die *intakten* Bandscheiben verhielten sich im Verlaufe der Zeit sowohl bei der Zelldichte als auch bezüglich der Cluster relativ konstant. Auffällig war bei allen Präparaten die Ansammlung von

extrazellulärer Matrix rund um die Zellcluster. Dies wurde sowohl bei der AggreCAN- als auch bei der Kollagen II-Färbung beobachtet und lässt auf einen regenerativen Charakter der Chondrozytencluster in den Bandscheiben schliessen.

Die Genexpression von Kollagen X bewegt sich im Bereich des vorangegangenen *Albugel*-Versuchs von Benz et al. auf tiefem Niveau [62], was darauf hinweist, dass es sich bei den untersuchten Zellen nicht um hypertroph entartete handelt.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der jedoch in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurde, ist die Überlebensfähigkeit der implantierten Zellen in der Bandscheibe. Durch die vorgängige Markierung der zu implantierenden Chondrozyten in-vitro mit einem fluoreszierenden Farbstoff könnten die überlebenden Zellen nach der Schlachtung der Tiere sichtbar gemacht werden [40]. Auch über das Geschlechtschromosom können Zellen voneinander unterschieden werden [70]. Es wäre also auch eine Möglichkeit gewesen, als Spender und Empfänger Schafe unterschiedlichen Geschlechts zu wählen und später in den Präparaten Zellen mit dem Geschlecht des Spendertieres zu detektieren. In der vorliegenden Studie wurden allogene Zellen von einem Spendertier implantiert. Die Frage, ob autologe Zellen eine verbesserte Wirkung gezeigt hätten, muss in dieser Studie ungeklärt bleiben, sollte aber für zukünftige Studien in Betracht gezogen werden.

Aus der Untersuchung der intakten Kontrollbandscheiben gingen unerwartete Ergebnisse hervor. Die MRI-Untersuchung zeigte auch bei den intakten Bandscheiben Degenerationszeichen und in den Histologiepräparaten waren granuläre Veränderungen zu sehen. Fibrotische Prozesse im Nucleus kamen jedoch bei den ungeschädigten Präparaten kaum vor. Die Resultate der intakten Bandscheiben blieben über den Beobachtungszeitraum nicht so konstant, wie



wir das erwartet hatten. Die Werte der ungeschädigten Bandscheiben zeigten meist ähnlich grosse Schwankungen wie diejenigen der geschädigten. So wurden bei den intakten Präparaten zu den verschiedenen Zeitpunkten ein schwankender Flächenanteil neutraler Glykosaminoglykane ermittelt und variable Gehalte an Kollagen, DNA und Glykosaminoglykan sowie inkonstante Genexpressionen von Kollagen II A1, Kollagen X und Lubricin gemessen.

Ein Grund für diese Schwankungen liegt wahrscheinlich in der allgemein grossen biologischen Varianz zwischen den einzelnen Tieren, was den Zustand und die biochemische Zusammensetzung ihrer Bandscheiben angeht. Es wäre aber auch denkbar, dass der Zustand der intakten Bandscheiben von den benachbarten geschädigten beeinflusst wurde. Bekannt ist, dass sich die segmentale Biomechanik nach Fusion [37, 38] oder Fixation [39] von Wirbeln verändert und damit eine verstärkte Degeneration der angrenzenden Bandscheiben verursachen kann. Auch die im vorliegenden Versuch durchgeführten Eingriffe könnten einen Einfluss auf die Biomechanik der benachbarten Segmente gehabt haben; zum einen direkt durch die partielle Nukleotomie, zum anderen indirekt durch die Schädigung der stabilisierenden, paravertebralen Muskulatur und durch erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmediatoren aufgrund des Weichteiltraumas.

Insgesamt erschwert die grosse individuelle Varianz zwischen den einzelnen Schafen und Bandscheiben die Interpretation der Daten, welche durch diese breite Streuung Signifikanzen vermissen lassen. Diese Beobachtung wurde auch schon im letzten Schafversuch gemacht [62], obwohl bei beiden Studien auf eine ausgeglichene Versuchstiergruppe (vergleichbares Alter, Gewicht und dieselbe Rasse) geachtet wurde.

Für die statistische Auswertung könnte man sich überlegen, ob bei dieser hohen Varianz der Daten eher mit dem Median statt mit dem Mittelwert gerechnet

werden sollte. Allerdings zeigten sich in Durchlauf mit nicht-parametrischen Testen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Für die vorliegende Studie wurde aufgrund seiner anatomischen und bandscheibenphysiologischen Ähnlichkeiten mit dem Menschen [87-90, 93-96] das Schaf als Tiermodell gewählt.

Auch in diesem Versuch bestätigte sich, dass diese Tiere vergleichsweise unkompliziert in Haltung und Umgang sind [97]. Das durchschnittliche Körpergewicht der Schafe von  $73.4 \pm 7.5$  Kilogramm war zwar vergleichbar mit demjenigen eines erwachsenen Menschen. Wie oben erwähnt erschwerten jedoch die engeren anatomischen Verhältnisse in der Schafbandscheibe das Einbringen der Biopsiestanze und das ausgeprägtere Muskel- und Fettgewebe machte einen offenen chirurgischen Eingriff nötig.

Das Schaf galt bisher im Bereich der Bandscheibenforschung als Tiermodell zur Untersuchung von induzierten Schäden und nicht als Modell für spontane Degenerationsprozesse [57, 62, 92, 107]. Die hier ermittelten Untersuchungsergebnisse lassen jedoch eine frühe altersbedingte Degeneration der Schafbandscheiben vermuten. Um diesen Faktor auszuklammern, werden teilweise auch jüngere Tiere für Versuche verwendet. In einer Studie mit Schafen im Alter von 10-12 Monaten wurden die Tiere vor der Schädigung im MRI untersucht und alle Bandscheiben mit Pfirman Grad I bewertet [107]. Die Skelettstreife ist jedoch in diesem Alter noch nicht vollständig abgeschlossen. Das Körpergewicht und die Ernährungssituation in der Bandscheibe entsprechen nicht den Verhältnissen eines erwachsenen Menschen. Ausserdem sind bei einem noch nicht ausgewachsenen Schaf vermehrt notochordale Zellen in der Bandscheibe zu erwarten, welche das Regenerationsverhalten beeinflussen können [57].

Zur Schädigung der Bandscheiben wurde in dieser Studie die mechanische Induktion durch Punktion mit einer Biopsiestanze gewählt. Die unklaren Ergebnisse und der Vergleich mit den intakten Kontrollbandscheiben werfen die Frage auf, ob diese Art der Schädigung zum gewünschten Degenerationseffekt geführt hat. In der Literatur wird beschrieben, dass mit einem relevanten Schaden gerechnet werden kann, sobald der Durchmesser der Punktionsnadel 40% der Bandscheibenhöhe übersteigt [114]. Hier wurde eine 13G-Stanze mit einem Durchmesser von 2.304mm verwendet. Die Höhe der geschädigten Bandscheiben betrug durchschnittlich zwischen 3.95mm und 4.61mm. Der Durchmesser der Stanze war also mindestens halb so gross wie die Bandscheibenhöhe der Schafe. Das Schadensmodell müsste dementsprechend zum gewünschten degenerativen Effekt geführt haben. Da es keine durchgehenden, relevanten Unterschiede zwischen den Zeitgruppen gab, ist nun die Frage, ob es möglich ist, dass sich die Bandscheiben innert nur 7 Wochen von selbst regenerieren können, vor allem wenn nicht parallel irgendwelche Veränderungen in den angrenzenden Endplatten der Wirbelkörper vorhanden sind, wie das bei den durch Krankheit verursachten Bandscheibendegenerationen der Fall ist. Bezüglich der Regenerationskapazität von Schafbandscheiben sind in der Literatur widersprüchliche Angaben zu finden. Im Versuch von Benz et al. zeigten die Tiere eine ausserordentlich hohe Selbstheilung innert 6 Monaten [62]. Andere Autoren messen der Bandscheibe des Schafs nur geringes Selbstregenerationspotential zu, insbesondere wegen der fehlenden notochordalen Zellen beim adulten Tier [57].

Vergleicht man die hier ermittelten biochemischen Resultate mit jenen eines Versuchs, bei dem die Degeneration chemisch mittels Bromdesoxyuridin induziert wurde [107], kann diskutiert werden, ob erfolgreiche chemische Schadensmodelle gewisse Mechanismen innerhalb der Bandscheibe stärker beeinträchtigen als mechanische.

Um die Resultate aus Studien zu neuen Therapieansätzen richtig einordnen zu können, gilt es ausserdem grundlegend zu klären, inwiefern sich die induzierte Degeneration von der spontanen unterscheidet und ob sich daraus Konsequenzen für das Regenerationspotential ergeben [102].

Es liegt auf der Hand, dass Modelle spontaner Degeneration am geeignetsten wären, um die natürlichen, pathophysiologischen Prozesse zu analysieren [93]. Auch sind bei Modellen mit induziertem Schaden keine Aussagen möglich bezüglich der Fragestellung, ob die implantierten Zellen trotz allfälliger genetischer Prädisposition für frühe Degeneration zu einer Regeneration der Bandscheibe beitragen können [77]. Trotz dieser Vorteile bleibt es schwierig, einheitliche prospektive Studien über spontan einsetzende Bandscheibendegeneration zu realisieren [93].

Grundsätzlich muss man sich stets bewusst sein, dass das „ideale Modell“ für die Bandscheibenforschung nicht existiert und bei der Übertragbarkeit vom Tiermodell auf den Menschen immer eine gewisse Vorsicht geboten ist [92].

Diese Studie zeigt, dass das adulte Schaf trotz der in der Literatur genannten Vorteile für Versuche dieser Art nicht das ideale Tiermodell zu sein scheint. Die Schafbandscheiben unterliegen bereits früh altersbedingten Degenerationsprozessen und weisen grosse interindividuelle Unterschiede in ihrer biochemischen Zusammensetzung auf.

Insgesamt lassen sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie keine Aussagen über die Wirkung von in *Albugel* eingebetteten Bandscheiben-Chondrozyten auf die Regeneration von vorgeschädigten Bandscheiben machen. Die breite Streuung der Daten verunmöglicht aufschlussreiche Vergleiche zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen und es fehlen statistisch relevante Ergebnisse oder auch nur klare Trends. Zum Vergleichen der Resultate wären präoperative Referenzwerte nötig, deren Erhebung jedoch

nur beschränkt möglich ist. Die benachbarten intakten Bandscheiben eignen sich nicht als Positivkontrolle, da auch sie bereits degenerativen Prozessen unterlagen. Hingegen bestätigt die vorliegende Studie die Resultate der früheren Studie, wo Veränderungen über einen längeren Zeitraum von 6 Monaten getestet wurden, dass auch zu früheren Zeitpunkten keine Fremdkörperreaktionen auf das injizierte Albugel mit oder ohne Zellen vorhanden waren und somit deren Anwendung keine Sicherheitsrisiken in sich trägt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Boos, N., et al., *Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science*. Spine, 2002. **27**(23): p. 2631-44.
2. Shine, K.M. and M. Spector, *The presence and distribution of lubricin in the caprine intervertebral disc*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2008. **26**(10): p. 1398-406.
3. Roughley, P., et al., *The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage*. European cells & materials, 2006. **11**: p. 1-7; discussion 7.
4. Cs-Szabo, G., et al., *Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration*. Spine, 2002. **27**(20): p. 2212-9.
5. Tittel, K., *Beschreibende und funktionelle Anatomie des Menschen*. 14. ed2003: Elsevier, Urban&Fischer Verlag.
6. Hiscock, D.R., B. Caterson, and C.R. Flannery, *Expression of hyaluronan synthases in articular cartilage*. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 2000. **8**(2): p. 120-6.
7. Benz, K., et al., *Rheological and biological properties of a hydrogel support for cells intended for intervertebral disc repair*. BMC musculoskeletal disorders, 2012. **13**(1): p. 54.
8. Schünke, M., *Funktionelle Anatomie - Topographie und Funktion des Bewegungssystems*2000: Georg Thieme Verlag.
9. Bernick, S. and R. Cailliet, *Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae*. Spine, 1982. **7**(2): p. 97-102.
10. Nachemson, A., et al., *In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs*. Acta orthopaedica Scandinavica, 1970. **41**(6): p. 589-607.
11. Urban, J.P., S. Smith, and J.C. Fairbank, *Nutrition of the intervertebral disc*. Spine, 2004. **29**(23): p. 2700-9.
12. Meisel, H.J., et al., *Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2006. **15 Suppl 3**: p. S397-405.
13. Urban, J.P. and S. Roberts, *Degeneration of the intervertebral disc*. Arthritis research & therapy, 2003. **5**(3): p. 120-30.
14. Antoniou, J., et al., *The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration*. The Journal of clinical investigation, 1996. **98**(4): p. 996-1003.

15. Kauppila, L.I., et al., *Disc degeneration/back pain and calcification of the abdominal aorta. A 25-year follow-up study in Framingham*. Spine, 1997. **22**(14): p. 1642-7; discussion 1648-9.
16. Kauppila, L.I., *Prevalence of stenotic changes in arteries supplying the lumbar spine. A postmortem angiographic study on 140 subjects*. Annals of the rheumatic diseases, 1997. **56**(10): p. 591-5.
17. Anderson, D.G., et al., *Cell-based therapy for disc repair*. The spine journal : official journal of the North American Spine Society, 2005. **5**(6 Suppl): p. 297S-303S.
18. Henriksson, H., et al., *Investigation of different cell types and gel carriers for cell-based intervertebral disc therapy, in vitro and in vivo studies*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2011.
19. Ciapetti, G., et al., *Ex vivo observation of human intervertebral disc tissue and cells isolated from degenerated intervertebral discs*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2012. **21 Suppl 1**: p. S10-9.
20. Sharp, C.A., et al., *Disc cell clusters in pathological human intervertebral discs are associated with increased stress protein immunostaining*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2009. **18**(11): p. 1587-94.
21. Johnson, W.E., S.M. Eisenstein, and S. Roberts, *Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation*. Connective tissue research, 2001. **42**(3): p. 197-207.
22. Hastreiter, D., R.M. Ozuna, and M. Spector, *Regional variations in certain cellular characteristics in human lumbar intervertebral discs, including the presence of alpha-smooth muscle actin*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2001. **19**(4): p. 597-604.
23. Evans, C., *Potential biologic therapies for the intervertebral disc*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 2006. **88 Suppl 2**: p. 95-8.
24. Mern, D.S., et al., *Enhancing human nucleus pulposus cells for biological treatment approaches of degenerative intervertebral disc diseases: a systematic review*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2012.
25. Hohaus, C., et al., *Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2008. **17 Suppl 4**: p. 492-503.
26. Rutges, J.P., et al., *Hypertrophic differentiation and calcification during intervertebral disc degeneration*. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 2010. **18**(11): p. 1487-95.

27. Nerlich, A.G., et al., *Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages*. Virchows Archiv : an international journal of pathology, 1998. **432**(1): p. 67-76.
28. Nerlich, A.G., E.D. Schleicher, and N. Boos, 1997 Volvo Award winner in basic science studies. *Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs*. Spine, 1997. **22**(24): p. 2781-95.
29. Boos, N., et al., *Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration*. Histochemistry and cell biology, 1997. **108**(6): p. 471-80.
30. Melrose, J., et al., *Calcification in the ovine intervertebral disc: a model of hydroxyapatite deposition disease*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2009. **18**(4): p. 479-89.
31. Weiler, C., et al., *Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls*. Spine, 2005. **30**(1): p. 44-53; discussion 54.
32. Kepler, C.K., et al., *Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments*. The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2011. **19**(9): p. 543-53.
33. Roberts, S., et al., *Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc*. Spine, 2000. **25**(23): p. 3005-13.
34. Kepler, C.K., et al., *The Expression and Relationship of Pro-inflammatory Chemokine RANTES/CCL5 and Cytokine IL-1beta in Painful Human Intervertebral Discs*. Spine, 2013.
35. Hristova, G.I., et al., *Calcification in human intervertebral disc degeneration and scoliosis*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2011. **29**(12): p. 1888-95.
36. Meisel, H.J., et al., *Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc*. Biomolecular engineering, 2007. **24**(1): p. 5-21.
37. Gillet, P., *The fate of the adjacent motion segments after lumbar fusion*. Journal of spinal disorders & techniques, 2003. **16**(4): p. 338-45.
38. Schlegel, J.D., J.A. Smith, and R.L. Schleusener, *Lumbar motion segment pathology adjacent to thoracolumbar, lumbar, and lumbosacral fusions*. Spine, 1996. **21**(8): p. 970-81.
39. Etebar, S. and D.W. Cahill, *Risk factors for adjacent-segment failure following lumbar fixation with rigid instrumentation for degenerative instability*. Journal of neurosurgery, 1999. **90**(2 Suppl): p. 163-9.
40. Huang, B., et al., *Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model*. Spine, 2011. **36**(26): p. 2252-9.



41. Nishimura, K. and J. Mochida, *Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study*. Spine, 1998. **23**(14): p. 1531-8; discussion 1539.
42. Nomura, T., et al., *Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration*. Clinical orthopaedics and related research, 2001(389): p. 94-101.
43. Reitmaier, S., et al., *In vitro and in silico investigations of disc nucleus replacement*. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society, 2012. **9**(73): p. 1869-79.
44. Okuma, M., et al., *Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2000. **18**(6): p. 988-97.
45. Lotz, J.C., et al., *New treatments and imaging strategies in degenerative disease of the intervertebral disks*. Radiology, 2012. **264**(1): p. 6-19.
46. Walsh, A.J., D.S. Bradford, and J.C. Lotz, *In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs*. Spine, 2004. **29**(2): p. 156-63.
47. Miyamoto, K., et al., *Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs*. The spine journal : official journal of the North American Spine Society, 2006. **6**(6): p. 692-703.
48. Nagae, M., et al., *Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres*. Tissue engineering, 2007. **13**(1): p. 147-58.
49. Sawamura, K., et al., *Characterization of in vivo effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on degenerated intervertebral discs*. Tissue engineering. Part A, 2009. **15**(12): p. 3719-27.
50. Sinclair, S.M., et al., *Attenuation of inflammatory events in human intervertebral disc cells with a tumor necrosis factor antagonist*. Spine, 2011. **36**(15): p. 1190-6.
51. Gorth, D.J., et al., *IL-1ra delivered from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres attenuates IL-1beta-mediated degradation of nucleus pulposus in vitro*. Arthritis research & therapy, 2012. **14**(4): p. R179.
52. Leckie, S.K., et al., *Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model*. The spine journal : official journal of the North American Spine Society, 2012. **12**(1): p. 7-20.
53. Cassinelli, E.H., R.A. Hall, and J.D. Kang, *Biochemistry of intervertebral disc degeneration and the potential for gene therapy applications*. The spine journal : official journal of the North American Spine Society, 2001. **1**(3): p. 205-14.
54. Robbins, P.D. and S.C. Ghivizzani, *Viral vectors for gene therapy*. Pharmacology & therapeutics, 1998. **80**(1): p. 35-47.

55. Xi, Y.M., et al., *Co-transfection of adeno-associated virus-mediated human vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 into annulus fibrosus cells of rabbit degenerative intervertebral discs*. Genetics and molecular research : GMR, 2013. **12**(AOP).
56. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. **944**: p. 62-73.
57. Woiciechowsky, C., et al., *Regeneration of nucleus pulposus tissue in an ovine intervertebral disc degeneration model by cell-free resorbable polymer scaffolds*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2012.
58. Hu, J., et al., *Injectable silk fibroin/polyurethane composite hydrogel for nucleus pulposus replacement*. Journal of materials science. Materials in medicine, 2012. **23**(3): p. 711-22.
59. Pereira, D.R., et al., *Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration*. Tissue engineering. Part C, Methods, 2011. **17**(10): p. 961-72.
60. Sive, J.I., et al., *Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs*. Molecular pathology : MP, 2002. **55**(2): p. 91-7.
61. Gerson, S.L., *Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens*. Nature medicine, 1999. **5**(3): p. 262-4.
62. Benz, K., et al., *Intervertebral disc cell- and hydrogel-supported and spontaneous intervertebral disc repair in nucleotomized sheep*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2012.
63. Behnia, H., et al., *Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report*. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2012. **40**(1): p. 2-7.
64. Davatchi, F., et al., *Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients*. International journal of rheumatic diseases, 2011. **14**(2): p. 211-5.
65. Richardson, S.M., et al., *Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering*. Journal of cellular physiology, 2010. **222**(1): p. 23-32.
66. Hoogendoorn, R.J., et al., *Adipose stem cells for intervertebral disc regeneration: current status and concepts for the future*. Journal of cellular and molecular medicine, 2008. **12**(6A): p. 2205-16.
67. Ganey, T., et al., *Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model*. Spine, 2009. **34**(21): p. 2297-304.
68. He, F. and M. Pei, *Rejuvenation of nucleus pulposus cells using extracellular matrix deposited by synovium-derived stem cells*. Spine, 2012. **37**(6): p. 459-69.

69. Risbud, M.V., et al., *Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy*. Spine, 2004. **29**(23): p. 2627-32.
70. Acosta, F.L., Jr., et al., *Porcine intervertebral disc repair using allogeneic juvenile articular chondrocytes or mesenchymal stem cells*. Tissue engineering. Part A, 2011. **17**(23-24): p. 3045-55.
71. Sobajima, S., et al., *Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration*. The spine journal : official journal of the North American Spine Society, 2008. **8**(6): p. 888-96.
72. Revell, P.A., et al., *Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers*. Journal of materials science. Materials in medicine, 2007. **18**(2): p. 303-8.
73. Sakai, D., et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration*. Biomaterials, 2003. **24**(20): p. 3531-41.
74. Orozco, L., et al., *Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study*. Transplantation, 2011. **92**(7): p. 822-8.
75. Chou, A.I., A.T. Reza, and S.B. Nicoll, *Distinct intervertebral disc cell populations adopt similar phenotypes in three-dimensional culture*. Tissue engineering. Part A, 2008. **14**(12): p. 2079-87.
76. Hegewald, A.A., et al., *Adequacy of herniated disc tissue as a cell source for nucleus pulposus regeneration*. Journal of neurosurgery. Spine, 2011. **14**(2): p. 273-80.
77. Fasset, D.R., M.F. Kurd, and A.R. Vaccaro, *Biologic solutions for degenerative disk disease*. Journal of spinal disorders & techniques, 2009. **22**(4): p. 297-308.
78. Boyd, L.M. and A.J. Carter, *Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2006. **15 Suppl 3**: p. S414-21.
79. Omlor, G.W., et al., *Injection of a polymerized hyaluronic acid/collagen hydrogel matrix in an in vivo porcine disc degeneration model*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2012. **21**(9): p. 1700-8.
80. Chan, S.C. and B. Gantenbein-Ritter, *Intervertebral disc regeneration or repair with biomaterials and stem cell therapy—feasible or fiction?* Swiss medical weekly, 2012. **142**: p. w13598.
81. Vernengo, J., et al., *Synthesis and characterization of injectable bioadhesive hydrogels for nucleus pulposus replacement and repair of the damaged intervertebral disc*. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, 2010. **93**(2): p. 309-17.

82. Mauth, C., et al., *Cell-seeded polyurethane-fibrin structures--a possible system for intervertebral disc regeneration*. European cells & materials, 2009. **18**: p. 27-38; discussion 38-9.
83. Leone, G., et al., *Amidic alginate hydrogel for nucleus pulposus replacement*. Journal of biomedical materials research. Part A, 2008. **84**(2): p. 391-401.
84. Sasson, A., et al., *Hyperelastic mechanical behavior of chitosan hydrogels for nucleus pulposus replacement-experimental testing and constitutive modeling*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2012. **8**: p. 143-53.
85. Munarin, F., et al., *New perspectives in cell delivery systems for tissue regeneration: natural-derived injectable hydrogels*. Journal of applied biomaterials & functional materials, 2012. **10**(2): p. e67-81.
86. Scholz, B., et al., *Suppression of adverse angiogenesis in an albumin-based hydrogel for articular cartilage and intervertebral disc regeneration*. European cells & materials, 2010. **20**: p. 24-36; discussion 36-7.
87. Smit, T.H., *The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2002. **11**(2): p. 137-44.
88. Martini, L., et al., *Sheep model in orthopedic research: a literature review*. Comparative medicine, 2001. **51**(4): p. 292-9.
89. Wilke, H.J., et al., *Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine*. The Anatomical record, 1997. **247**(4): p. 542-55.
90. Beckstein, J.C., et al., *Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content*. Spine, 2008. **33**(6): p. E166-73.
91. Wilke, H.J., A. Kettler, and L.E. Claes, *Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines?* Spine, 1997. **22**(20): p. 2365-74.
92. Alini, M., et al., *Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration?* European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2008. **17**(1): p. 2-19.
93. Guterl, C.C., et al., *Challenges and strategies in the repair of ruptured annulus fibrosus*. European cells & materials, 2013. **25**: p. 1-21.
94. Hunter, C.J., J.R. Matyas, and N.A. Duncan, *Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison*. Journal of anatomy, 2004. **205**(5): p. 357-62.
95. Reid, J.E., et al., *Sheep lumbar intervertebral discs as models for human discs*. Clinical biomechanics, 2002. **17**(4): p. 312-4.

96. Costi, J.J., T.C. Hearn, and N.L. Fazzalari, *The effect of hydration on the stiffness of intervertebral discs in an ovine model*. Clinical biomechanics, 2002. **17**(6): p. 446-55.
97. Turner, A.S., *Animal models of osteoporosis--necessity and limitations*. European cells & materials, 2001. **1**: p. 66-81.
98. Gruber, H.E., et al., *Autologous intervertebral disc cell implantation: a model using Psammomys obesus, the sand rat*. Spine, 2002. **27**(15): p. 1626-33.
99. Gruber, H.E., et al., *The sand rat model for disc degeneration: radiologic characterization of age-related changes: cross-sectional and prospective analyses*. Spine, 2002. **27**(3): p. 230-4.
100. Lauerma, W.C., et al., *Age-related disk degeneration: preliminary report of a naturally occurring baboon model*. Journal of spinal disorders, 1992. **5**(2): p. 170-4.
101. Platenberg, R.C., et al., *Spontaneous disc degeneration in the baboon model: magnetic resonance imaging and histopathologic correlation*. Journal of medical primatology, 2001. **30**(5): p. 268-72.
102. Bergknut, N., et al., *The Dog as an Animal Model for Intervertebral Disc Degeneration?* Spine, 2012. **37**(5): p. 351-358.
103. Hamrick, M.W., C. Pennington, and C.D. Byron, *Bone architecture and disc degeneration in the lumbar spine of mice lacking GDF-8 (myostatin)*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2003. **21**(6): p. 1025-32.
104. Kimura, T., et al., *Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation*. International orthopaedics, 1996. **20**(3): p. 177-81.
105. Norcross, J.P., et al., *An in vivo model of degenerative disc disease*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2003. **21**(1): p. 183-8.
106. Takahashi, T., et al., *Chemonucleolytic effects of chondroitinase ABC on normal rabbit intervertebral discs. Course of action up to 10 days postinjection and minimum effective dose*. Spine, 1996. **21**(21): p. 2405-11.
107. Zhou, H., et al., *A new in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration characterized by MRI, radiography, CT/discogram, biochemistry, and histology*. Spine, 2007. **32**(8): p. 864-72.
108. Iatridis, J.C., et al., *Compression-induced changes in intervertebral disc properties in a rat tail model*. Spine, 1999. **24**(10): p. 996-1002.
109. Lotz, J.C., et al., *Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study*. Spine, 1998. **23**(23): p. 2493-506.
110. Osti, O.L., B. Vernon-Roberts, and R.D. Fraser, *1990 Volvo Award in experimental studies. Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model*. Spine, 1990. **15**(8): p. 762-7.

111. Kim, K.S., et al., *Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models*. Spine, 2005. **30**(1): p. 33-7.
112. Melrose, J., et al., *Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration*. Spine, 2002. **27**(12): p. 1278-85.
113. Masuda, K., et al., *A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration*. Spine, 2005. **30**(1): p. 5-14.
114. Elliott, D.M., et al., *The effect of relative needle diameter in puncture and sham injection animal models of degeneration*. Spine, 2008. **33**(6): p. 588-96.
115. Thompson, J.P., et al., *Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc*. Spine, 1990. **15**(5): p. 411-5.
116. Pfirrmann, C.W., et al., *Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration*. Spine, 2001. **26**(17): p. 1873-8.
117. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AB-PAS	Alcianblau-Periodic-Acid-Schiffs	L	Lendenwirbel
ADCI	Autologous Disc Cell Implantation	min	Minute
al.	alia (andere)	Mio.	Million
ANOVA	Analysis of variance	mg	Milligramm
AP	Alkalische Phosphatase	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumdichlorid
C	Celsius	ml	Milliliter
ca.	circa	µl	Mikroliter
CaCl <sub>2</sub>	Calciumdichlorid	mm	Millimeter
cm	Centimeter	MRI	Magnetic Resonance Imaging
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
DMMB	Dimethylmethylenblau	MSC	Mesenchymale Stammzellen
DMSO	Dimethylsulfoxid	Na	Natrium
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NaCl	Natriumchlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	nm	nanometer
HAES	Hydroxyethylstärke	Nr.	Nummer
IE	Internationale Einheiten	OP	Operation
i.m.	intramuskulär	PBS	Phosphate Buffered Saline
i.v.	intravenös	PCR	Polymerase Chain Reaction
IVD	Intervertebral disc	pH	potentia hydrogenii
G	Gauge	p.o.	per Os
g	mittlere Erdbeschleunigung	PR	Pikrosiriusrot
g	Gramm	RNA	Ribonukleinsäure
GAG	Glykosaminoglykan	rpm	rounds per minute
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	RT	Reverse Transkriptase
h	Stunde	s.c.	subkutan
HAS 2, HAS 3	Hyaluronansynthase Isoenzym 2 bzw. 3	Suva	Schweizerische Unfallversicherung
HE	Hämatoxylin-Eosin	T	Thorakalwirbel
kg	Kilogramm	us. Vet	usum veterinarium
KG	Körpergewicht	V., Vv.	Vene, Venen
Koll I, Koll II	Kollagen I, Kollagen II	ww	wet weight

## 8 Anhang

### 8.1 Diagramme

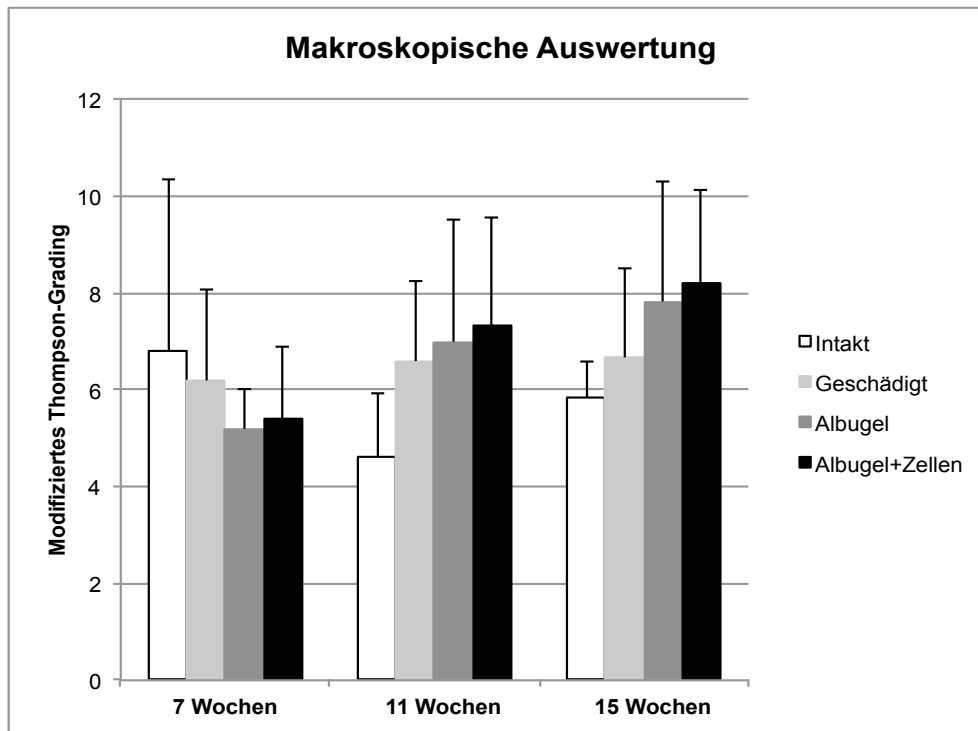


Diagramm 1: Makroskopische Auswertung

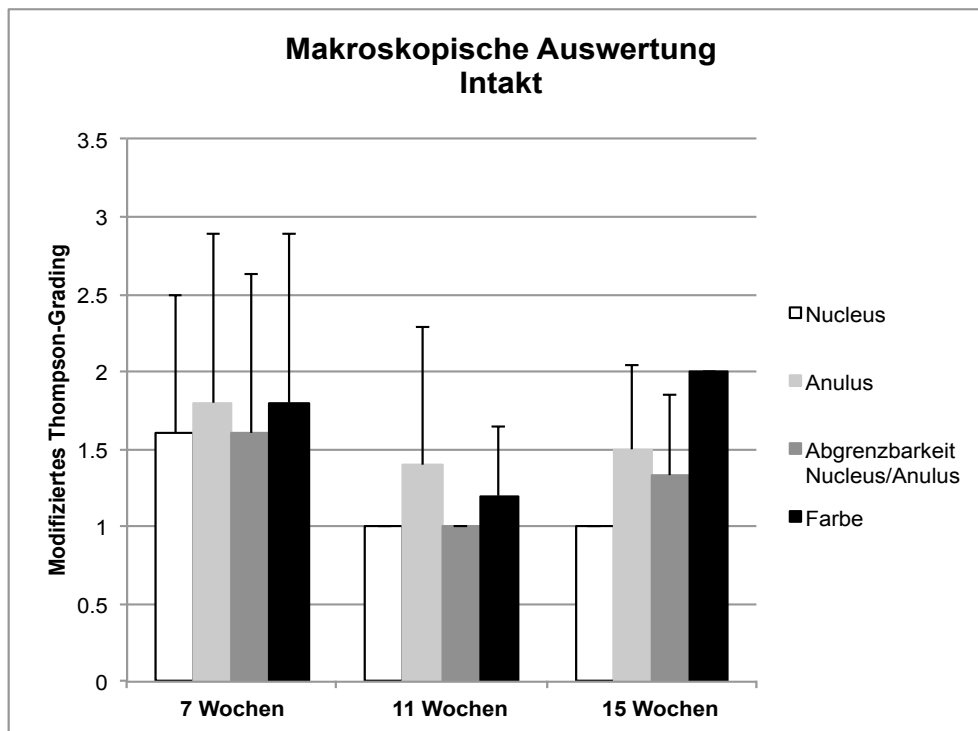


Diagramm 2: Makroskopische Auswertung der intakten Bandscheiben



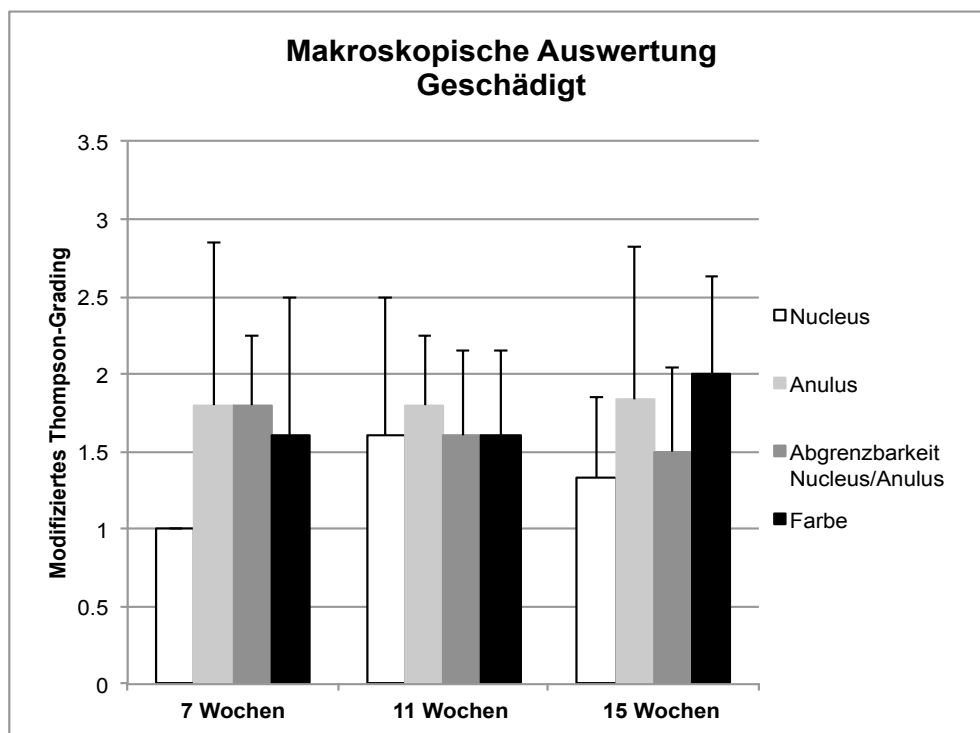


Diagramm 3: Makroskopische Auswertung der geschädigten, unbehandelten Bandscheiben

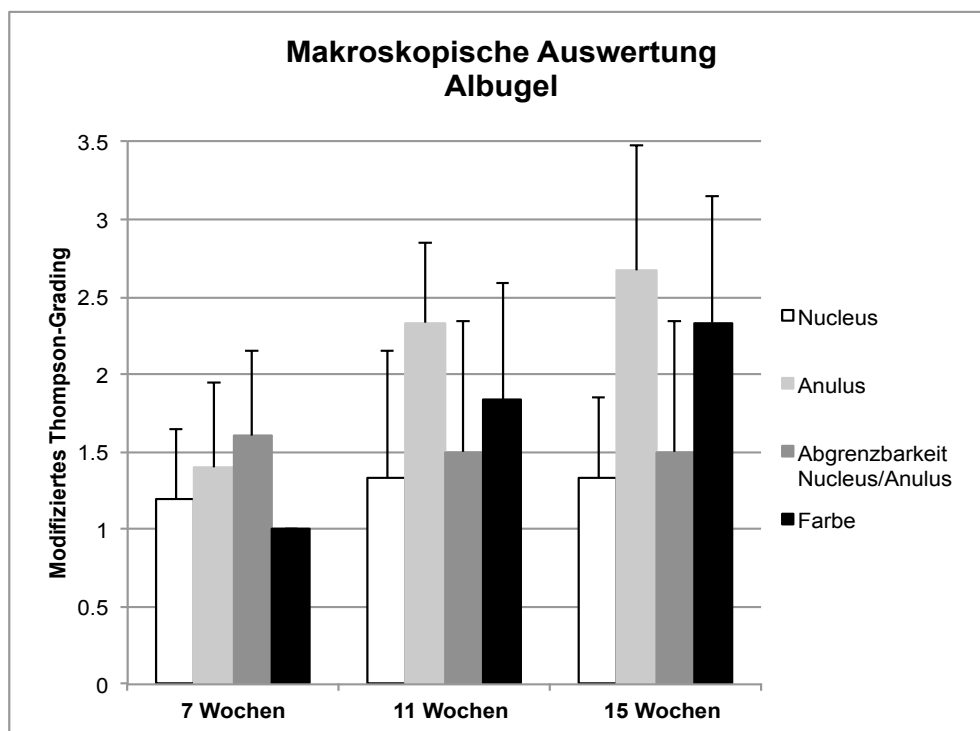


Diagramm 4: Makroskopische Auswertung der mit Albugel behandelten Bandscheiben

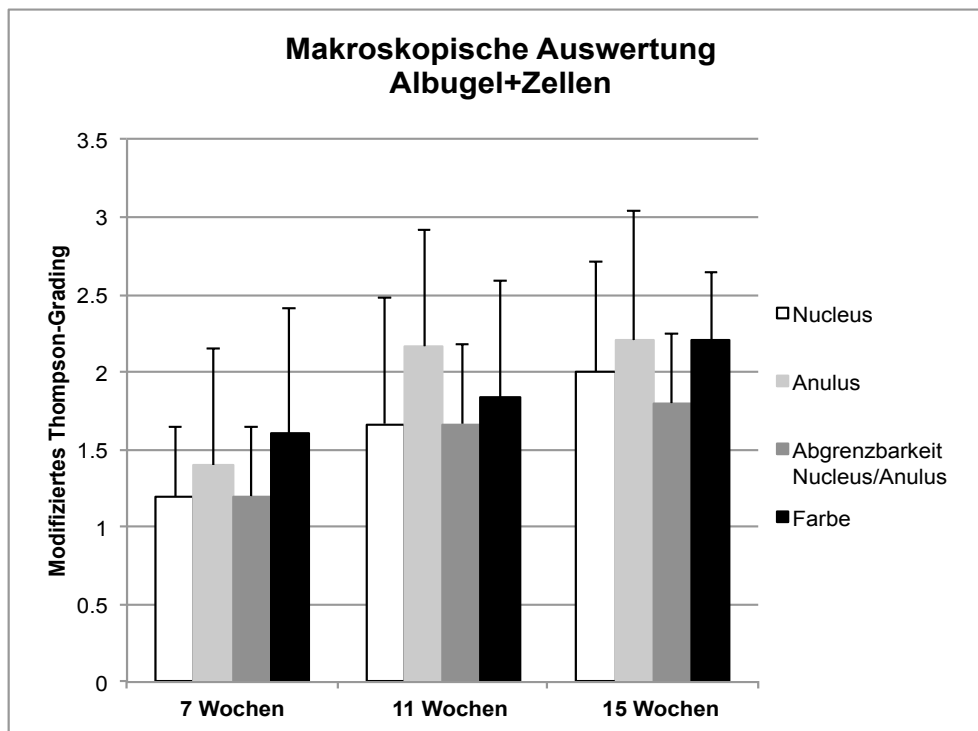


Diagramm 5: Makroskopische Auswertung der mit Albugel plus Zellen behandelten Bandscheiben

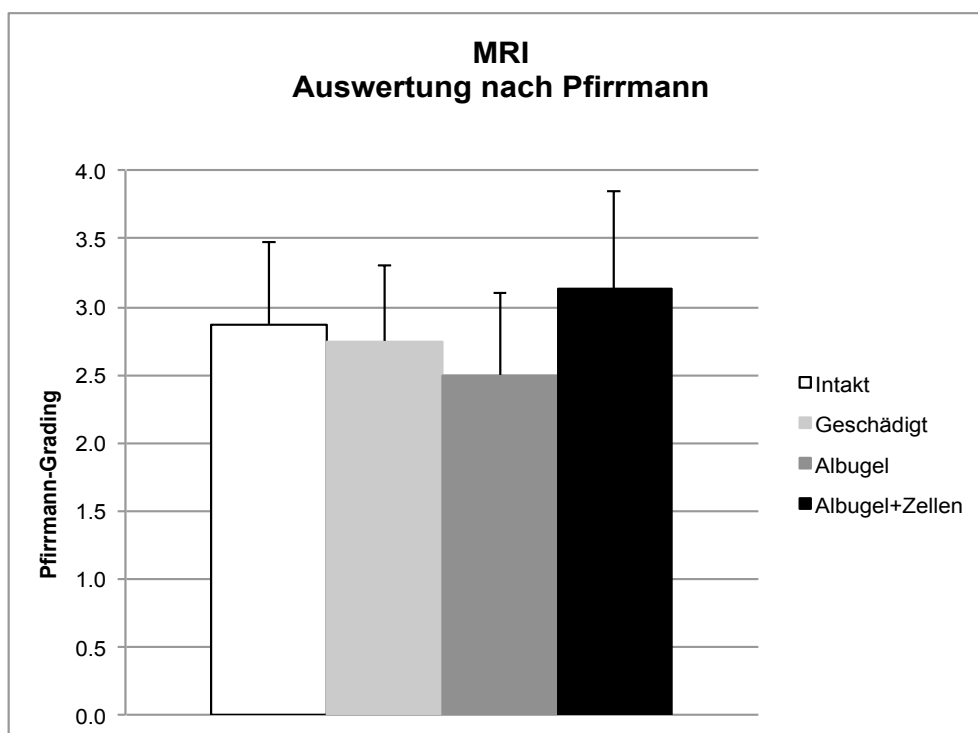


Diagramm 6: Auswertung der MRI-Aufnahmen nach Pfirrmann

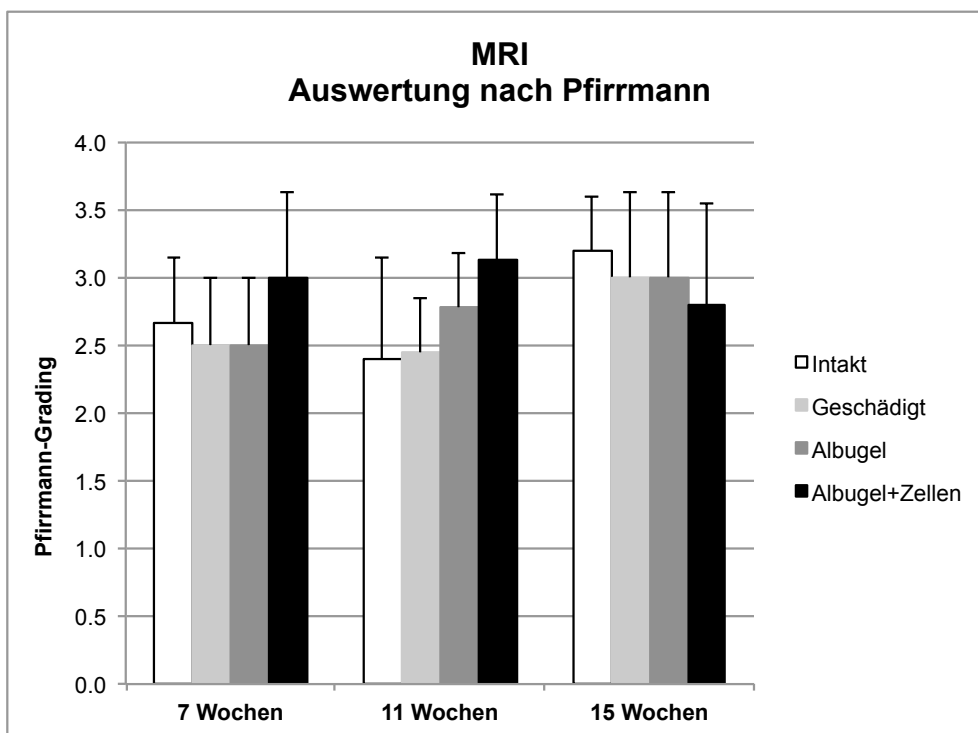


Diagramm 7: Auswertung der MRI-Aufnahmen nach Pfirrmann, aufgeteilt nach Zeitpunkten

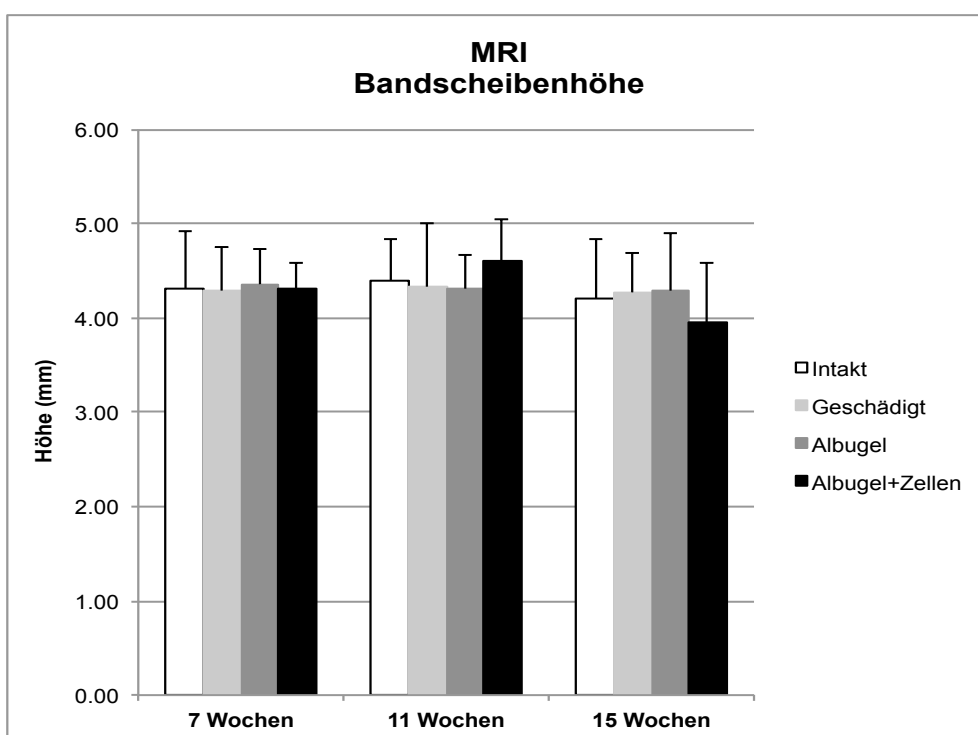


Diagramm 8: Absolute Bandscheibenhöhe, gemessen in MRI-Aufnahmen

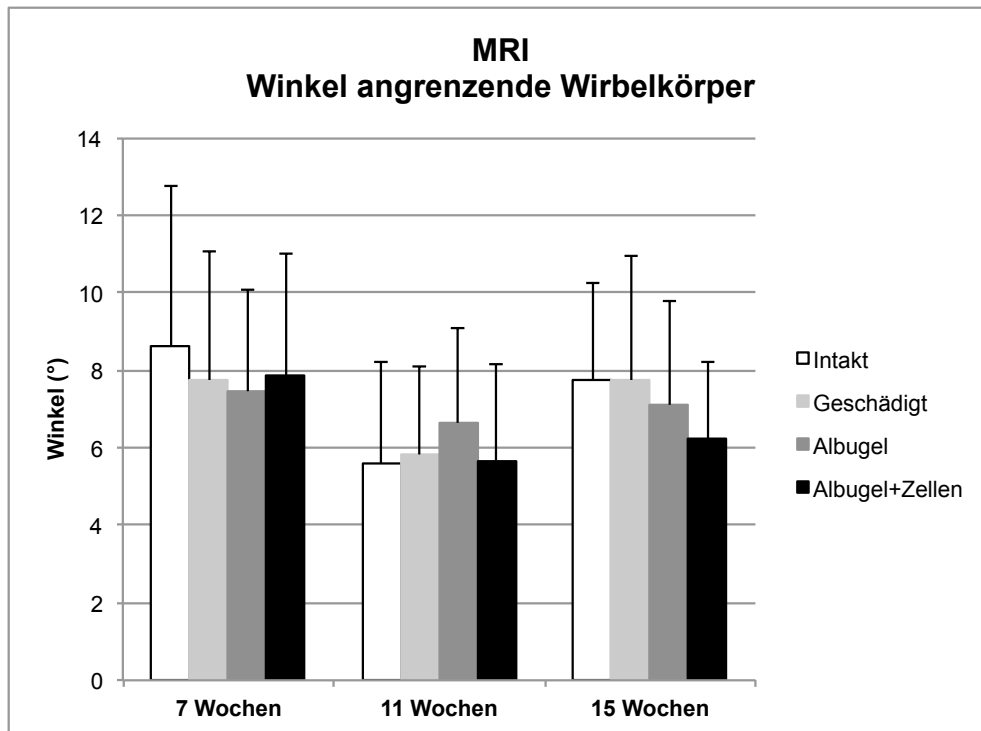


Diagramm 9: Winkel zwischen angrenzenden Wirbelkörpern

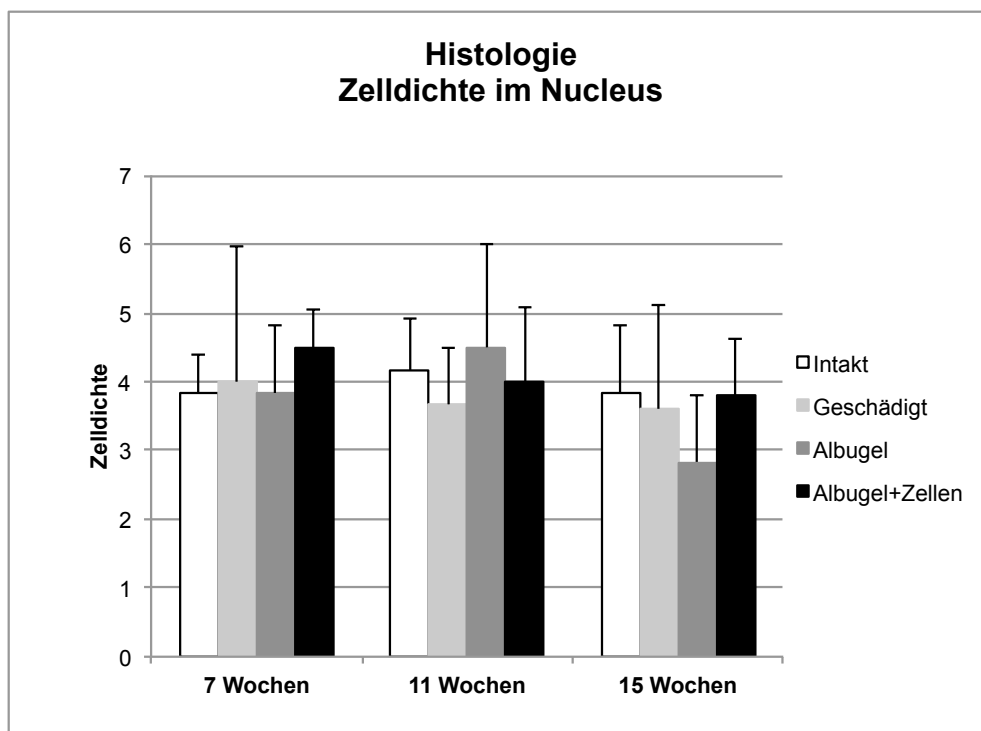


Diagramm 10: Zelldichte im Nucleus, HE-Färbung



Diagramm 11: Anzahl der Chondrozytencluster im Nucleus, HE-Färbung

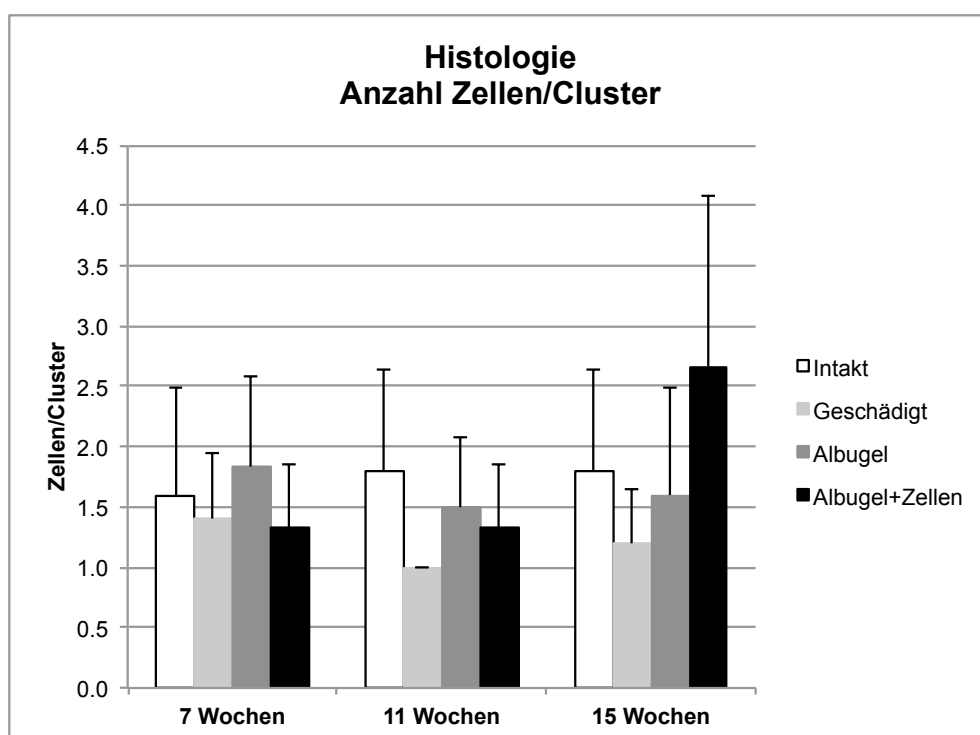


Diagramm 12: Anzahl Zellen pro Chondrozytencluster im Nucleus, HE-Färbung

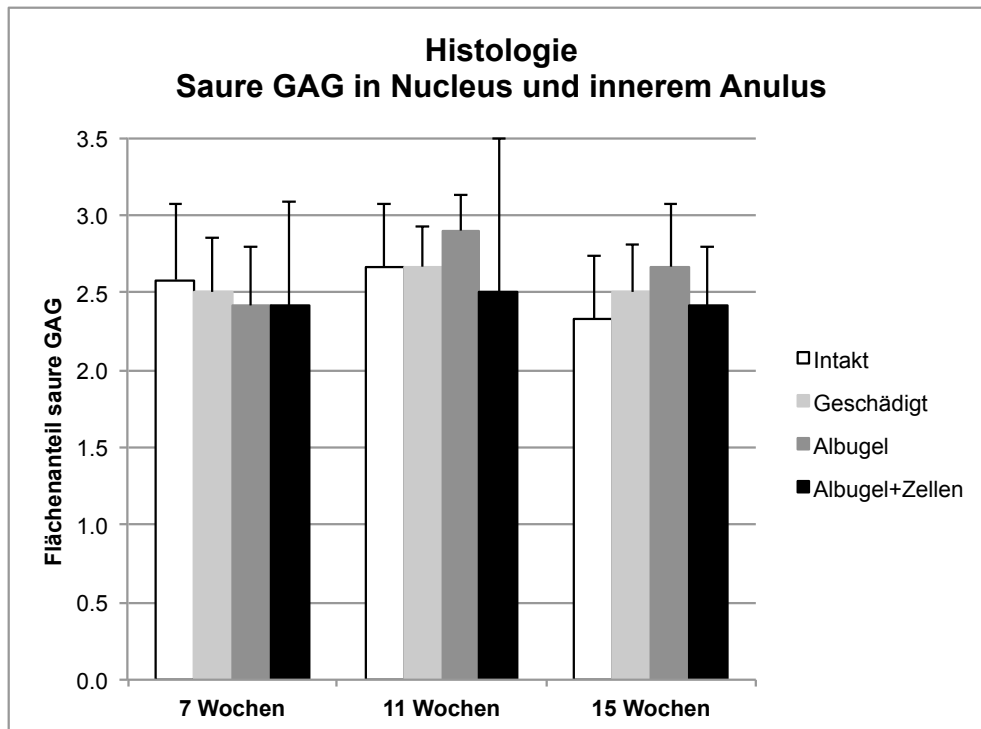


Diagramm 13: Flächenanteil der sauren GAG in Nucleus und innerem Anulus, AB-PAS-Färbung

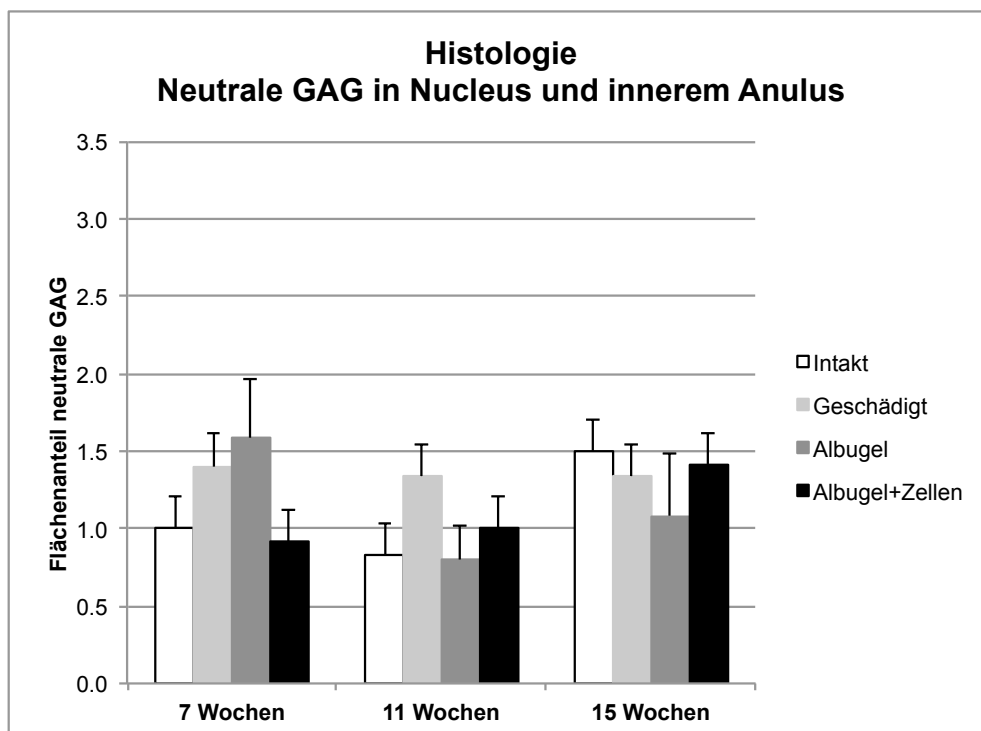


Diagramm 14: Flächenanteil der neutralen GAG in Nucleus und innerem Anulus, AB-PAS-Färbung

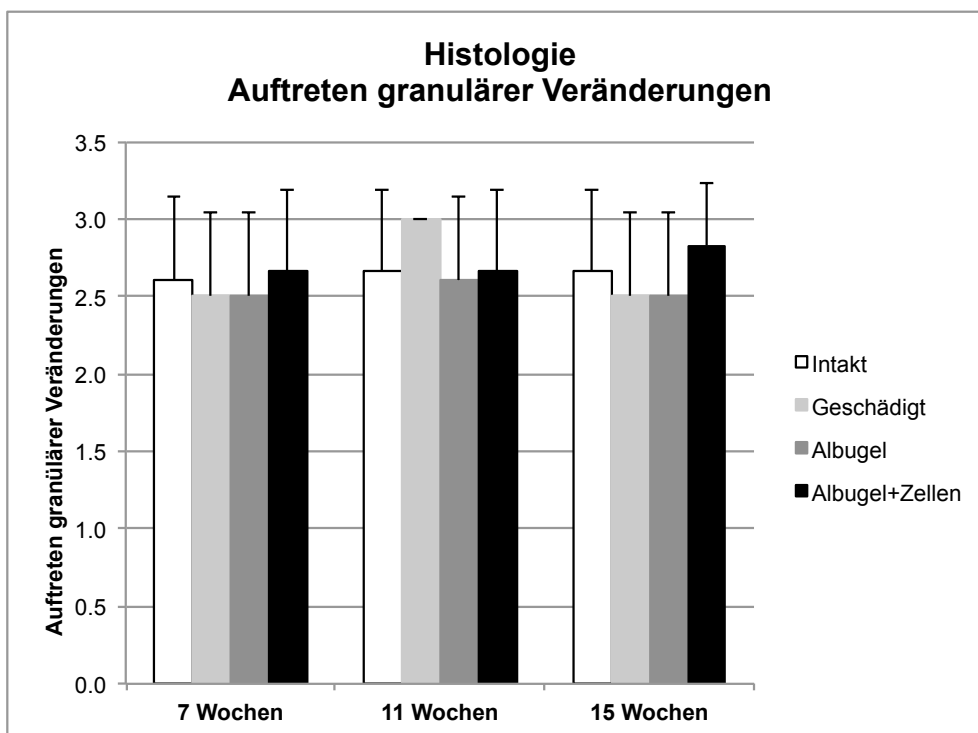


Diagramm 15: Häufigkeit von granulären Veränderungen, PR-Färbung

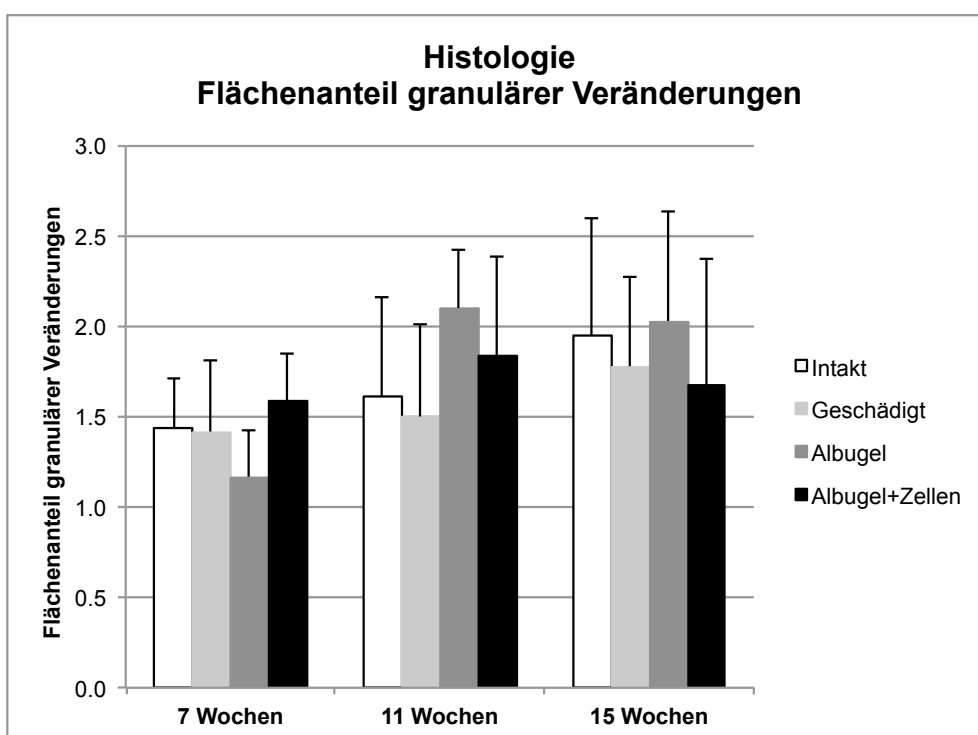


Diagramm 16: Flächenanteil von granulären Veränderungen, PR-Färbung

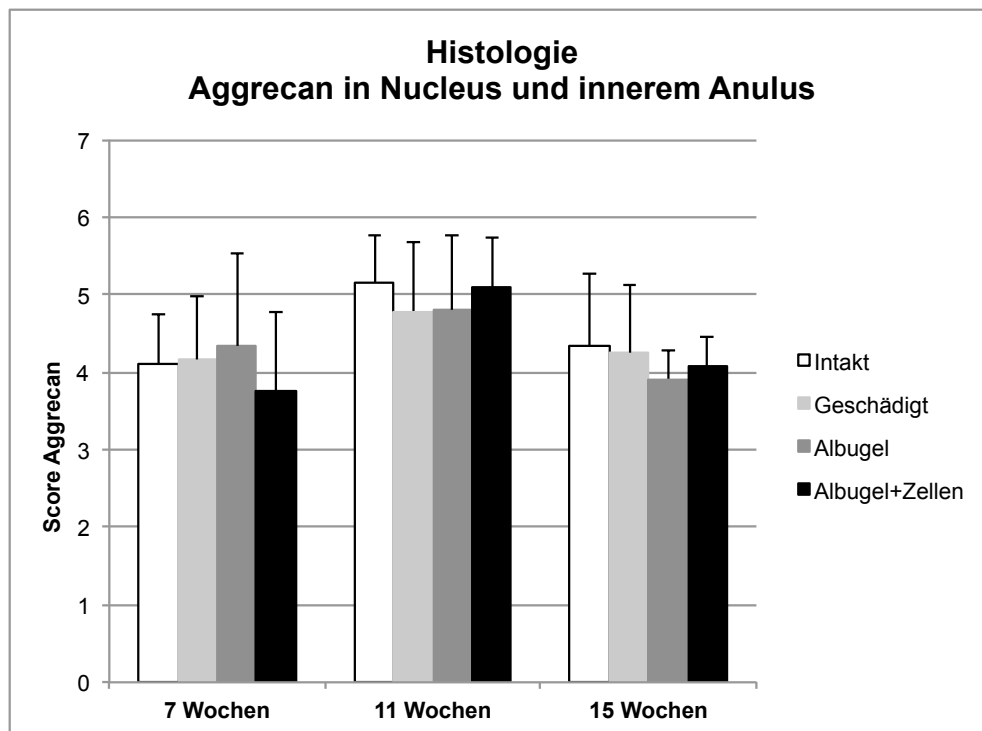


Diagramm 17: Score aus Flächenanteil und Farbintensität von Aggrecan in Nucleus und innerem Anulus

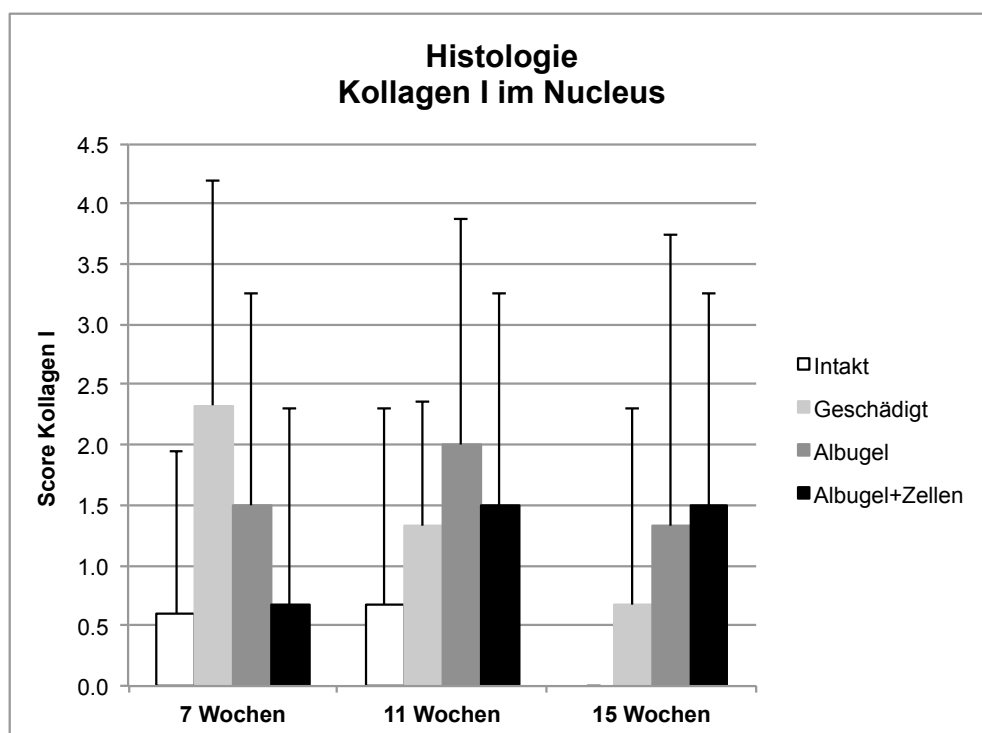


Diagramm 18: Score aus Flächenanteil und Farbintensität von Kollagen I im Nucleus



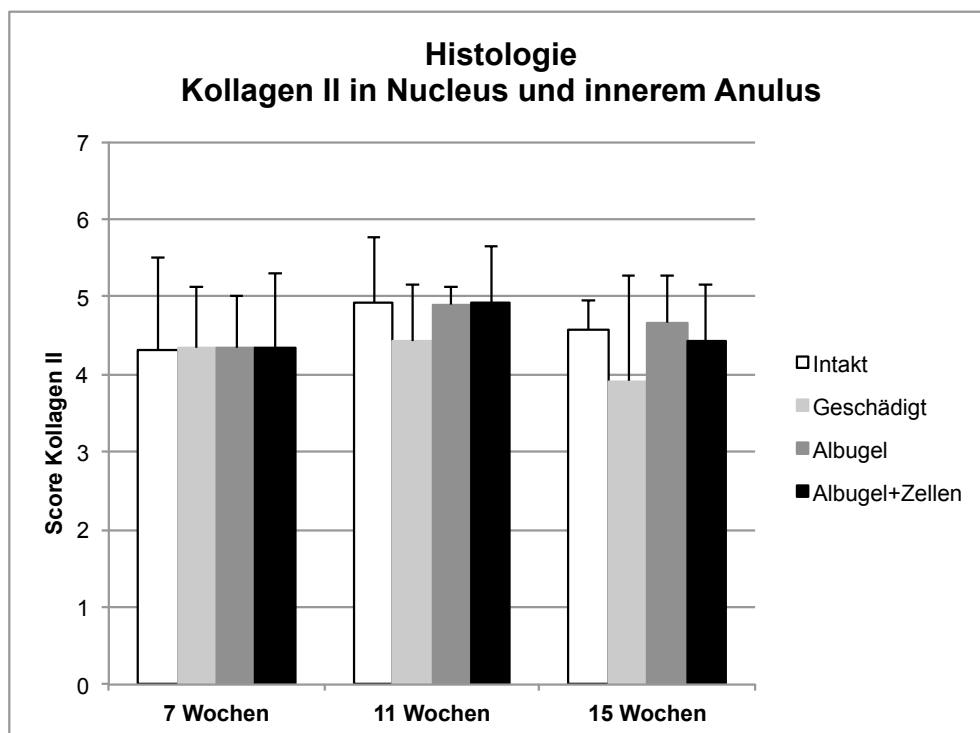


Diagramm 19: Score aus Flächenanteil und Farbintensität von Kollagen II in Nucleus und innerem Anulus

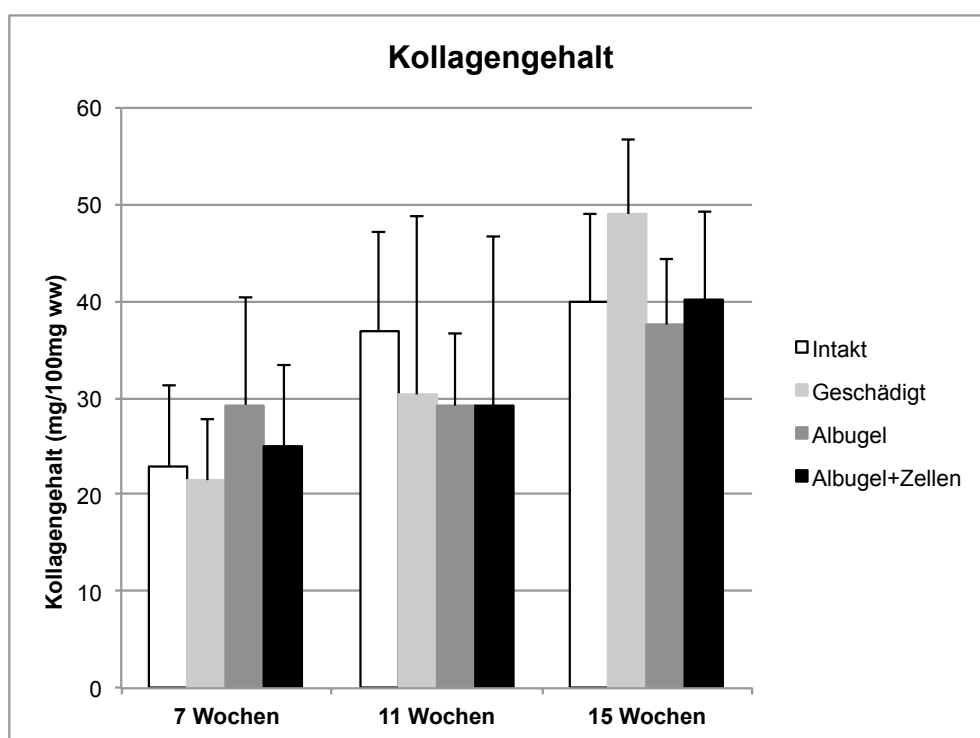


Diagramm 20: Kollagengehalt in mg pro 100mg Gewebe-Nassgewicht

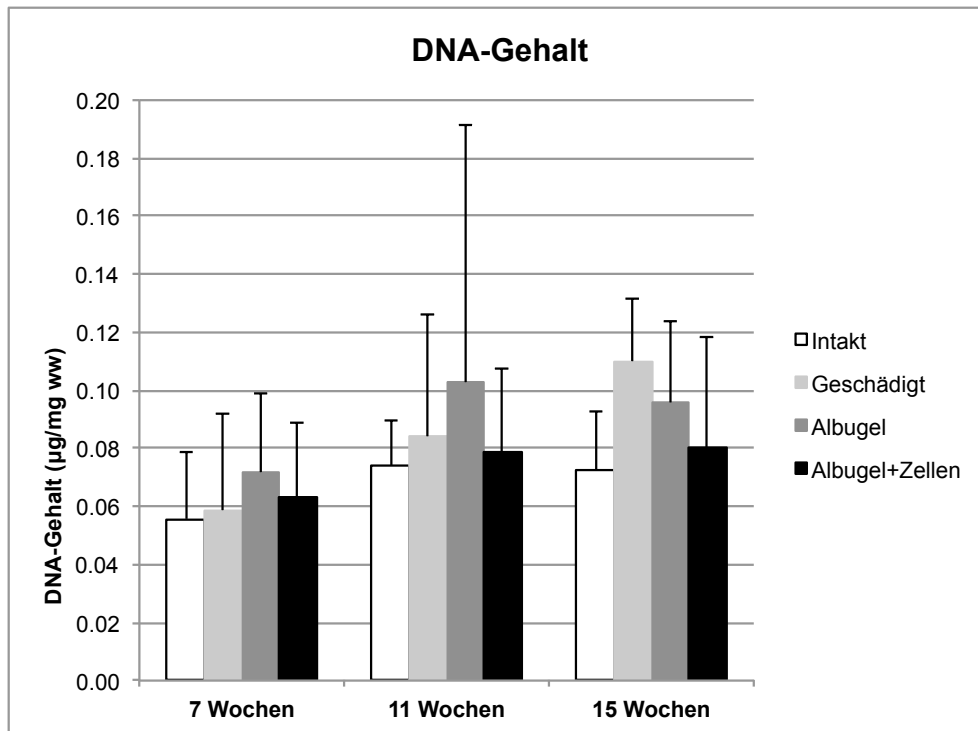


Diagramm 21: DNA-Gehalt in  $\mu\text{g pro mg Gewebe-Nassgewicht}$

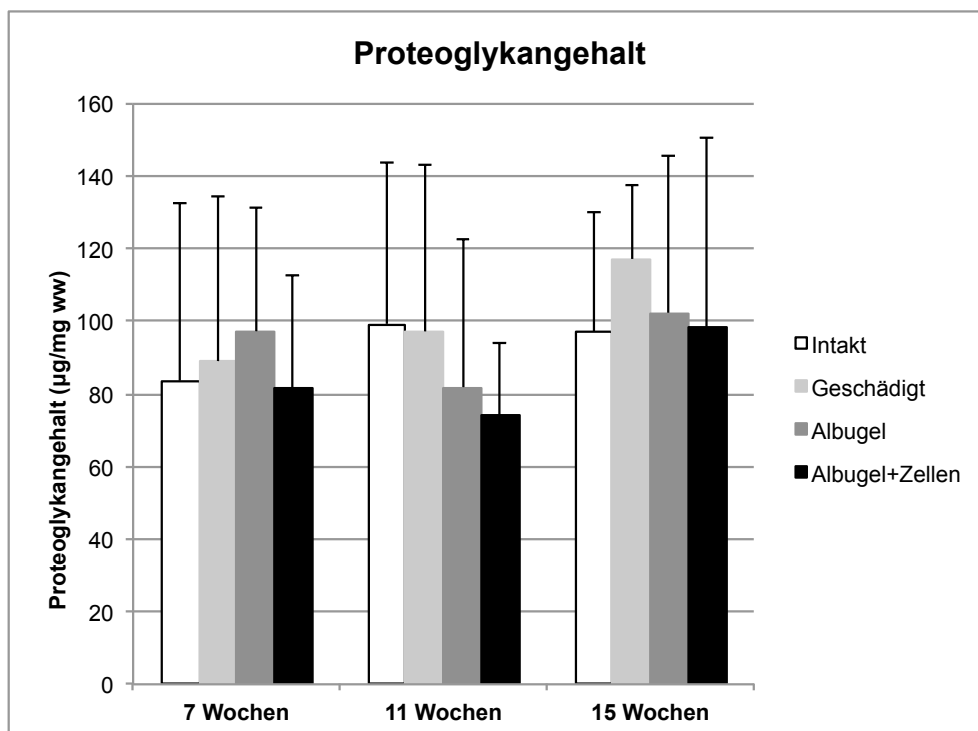
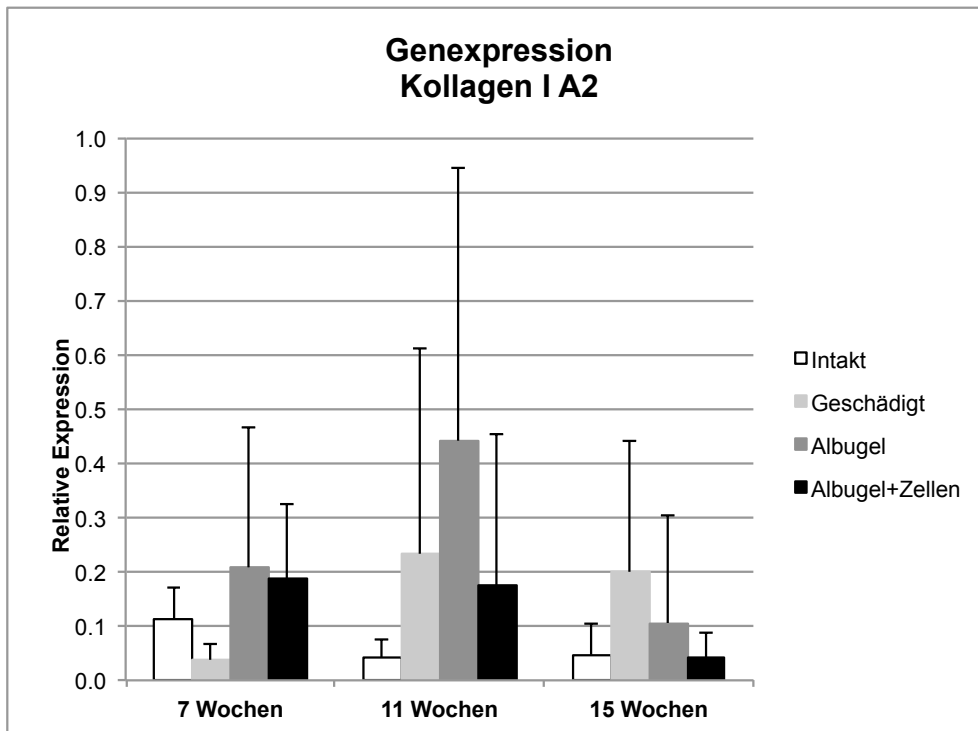
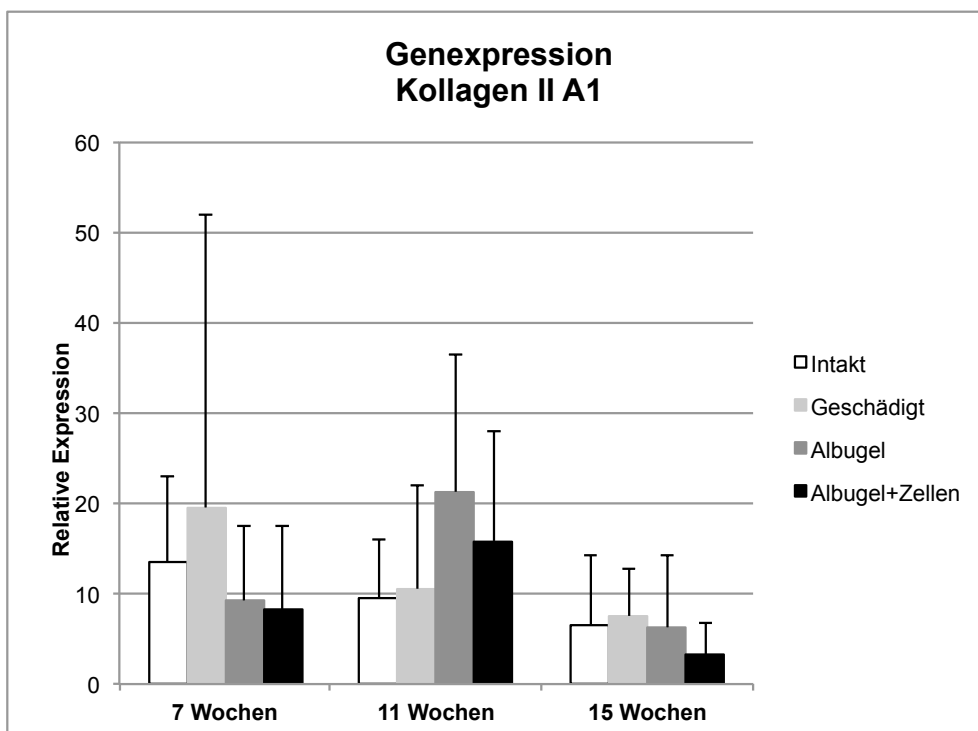


Diagramm 22: Proteoglykangehalt in  $\mu\text{g pro mg Gewebe-Nassgewicht}$

*Diagramm 23: Genexpression von Kollagen I A2**Diagramm 24: Genexpression von Kollagen II A1*

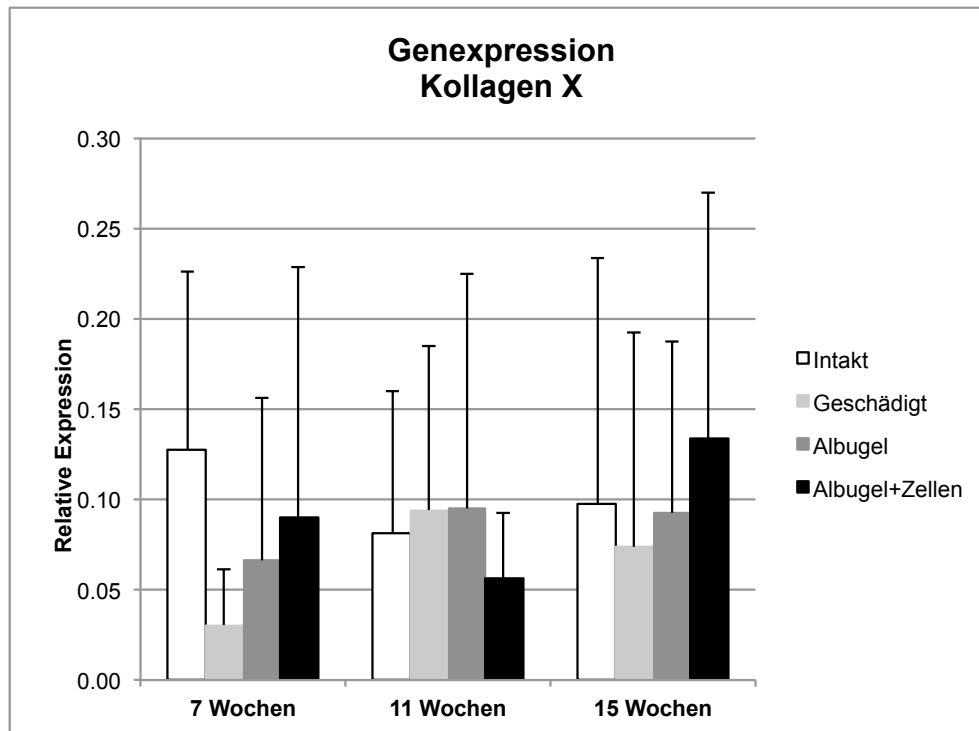


Diagramm 25: : Genexpression von Kollagen X

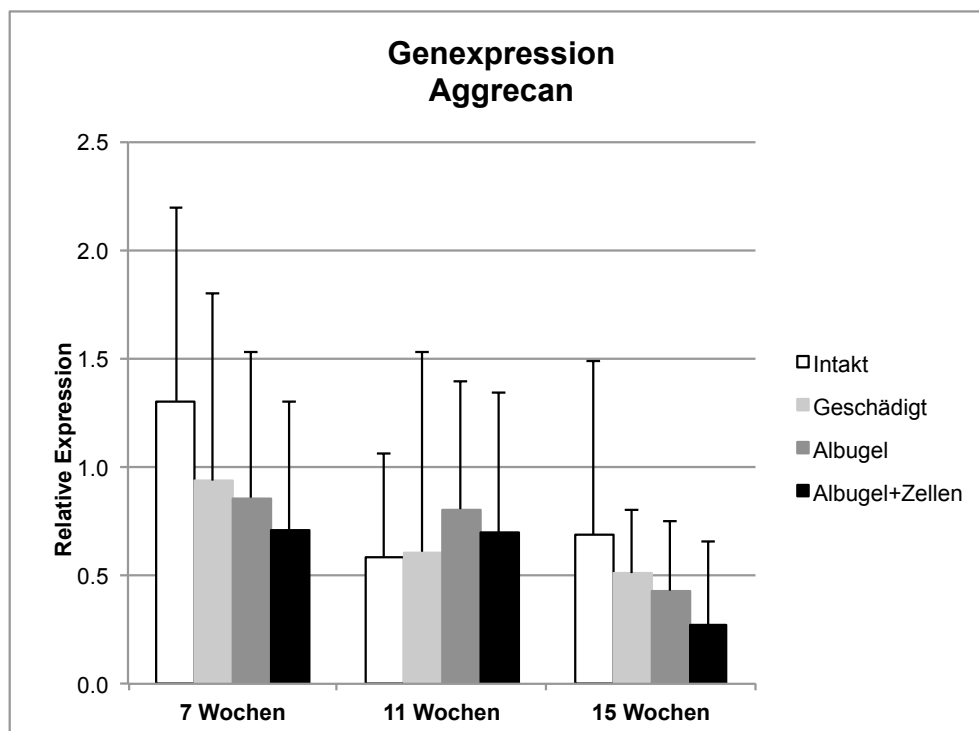


Diagramm 26: : Genexpression von Aggrecan

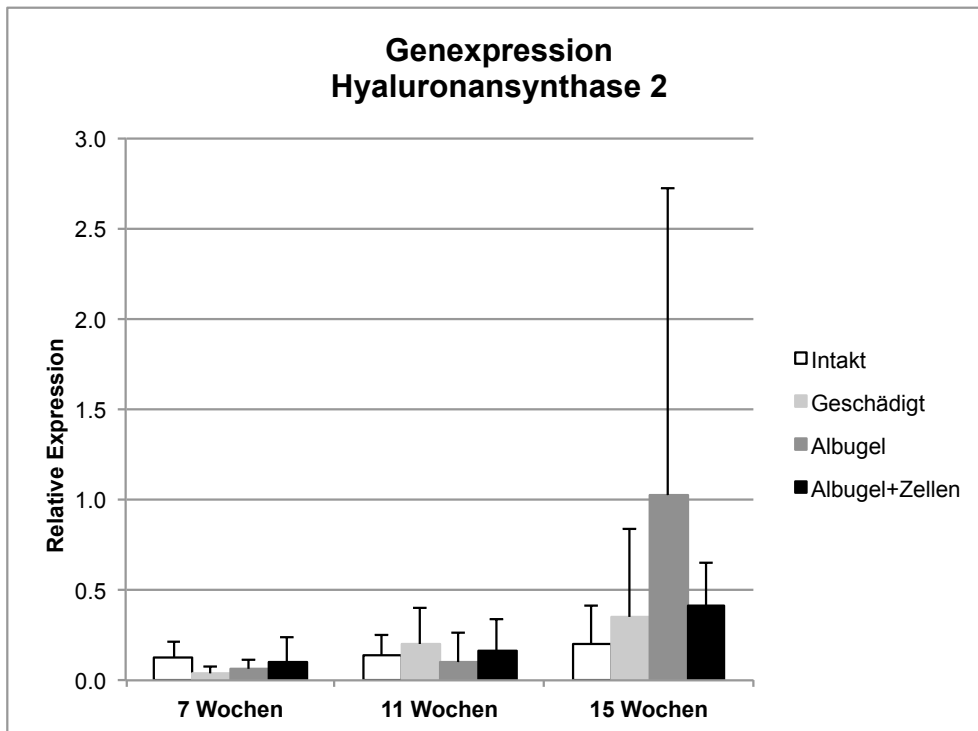


Diagramm 27:: Genexpression von Hyaluronansynthase Isoenzym 2

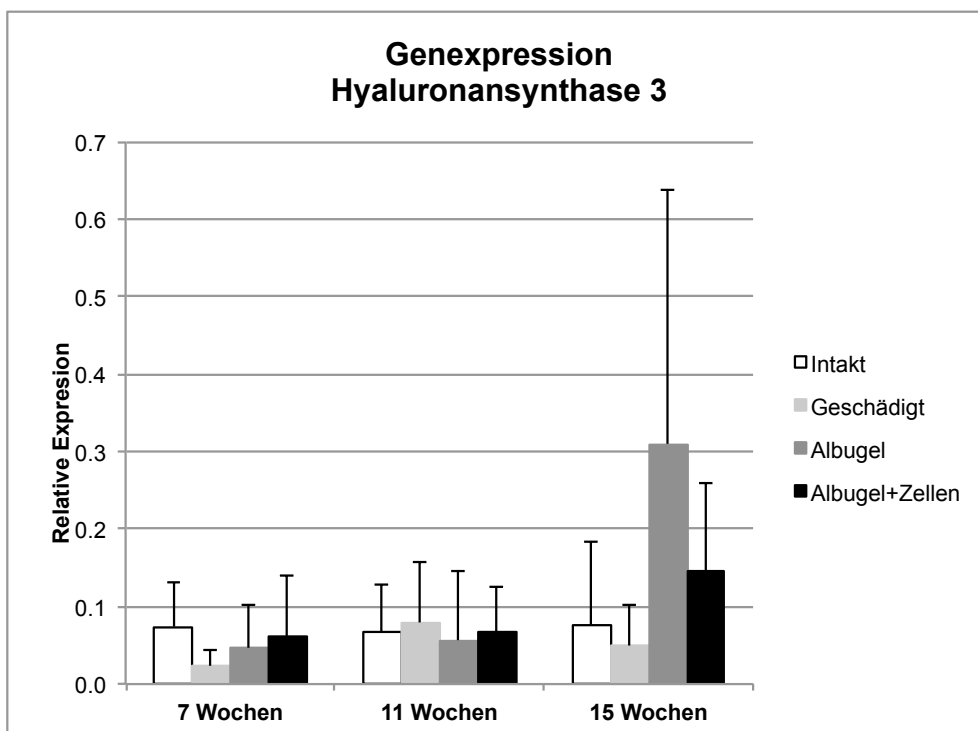


Diagramm 28: Genexpression von Hyaluronansynthase Isoenzym 3

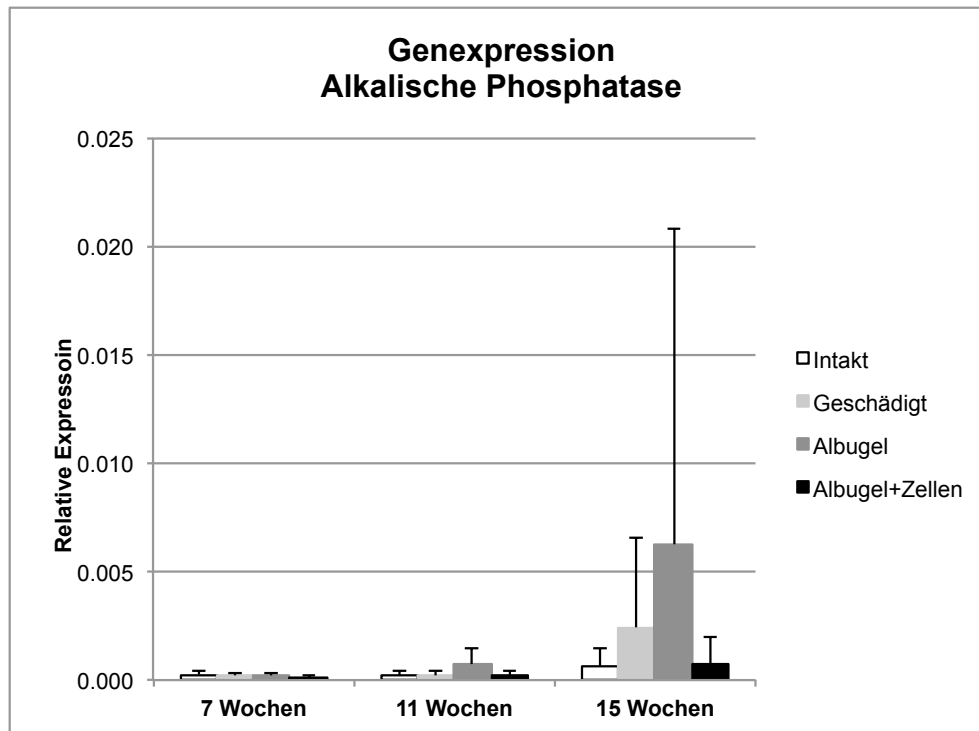


Diagramm 29: Genexpression von Alkalischer Phosphatase

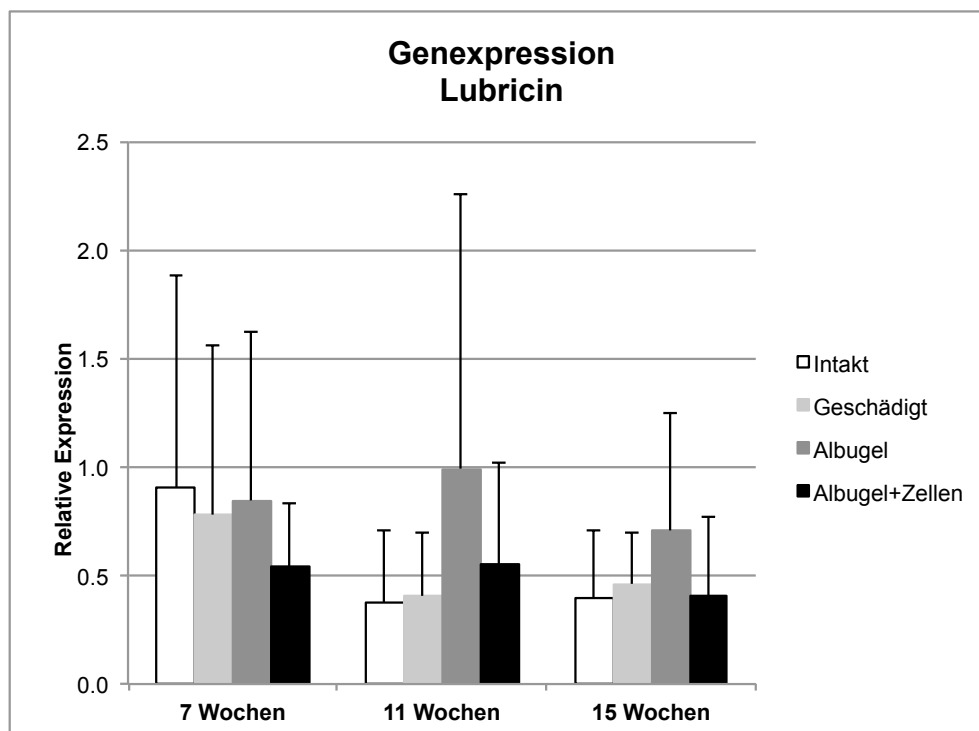


Diagramm 30: Genexpression von Lubricin

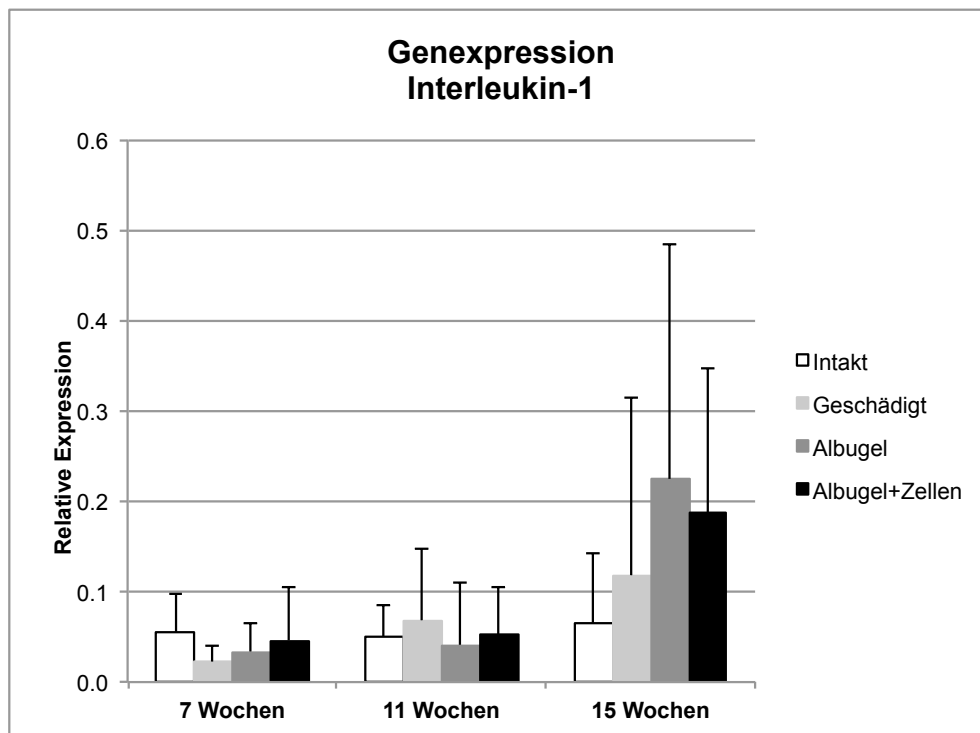


Diagramm 31: Genexpression von Interleukin-1

## 8.2 Tabellen

Makroskopische Beurteilung											
Behandlung	Zeit	Nucleus		Anulus		Abgrenzbarkeit Nucleus/Anulus		Farbe		Summe	
		Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Intakt	7 Wochen	1.60	0.89	1.80	1.10	1.60	0.89	1.80	1.10	6.80	3.56
Intakt	11 Wochen	1.00	0.00	1.40	0.89	1.00	0.00	1.20	0.45	4.60	1.34
Intakt	15 Wochen	1.00	0.00	1.50	0.55	1.33	0.52	2.00	0.00	5.83	0.75
Geschädigt	7 Wochen	1.00	0.00	1.80	0.84	1.80	0.45	1.60	0.89	6.20	1.92
Geschädigt	11 Wochen	1.60	0.89	1.80	0.45	1.60	0.55	1.60	0.55	6.60	1.67
Geschädigt	15 Wochen	1.33	0.52	1.83	0.98	1.50	0.55	2.00	0.63	6.67	1.86
Albugel	7 Wochen	1.20	0.45	1.40	0.55	1.60	0.55	1.00	0.00	5.20	0.84
Albugel	11 Wochen	1.33	0.82	2.33	0.52	1.50	0.84	1.83	0.75	7.00	2.53
Albugel	15 Wochen	1.33	0.52	2.67	0.82	1.50	0.84	2.33	0.82	7.83	2.48
Albugel plus Zellen	7 Wochen	1.20	0.45	1.40	0.55	1.20	0.45	1.60	0.55	5.40	1.52
Albugel plus Zellen	11 Wochen	1.67	0.82	2.17	0.75	1.67	0.52	1.83	0.75	7.33	2.25
Albugel plus Zellen	15 Wochen	2.17	0.75	2.33	0.82	2.00	0.63	2.33	0.52	8.83	2.32

Tabelle 10: Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung der Bandscheiben

MRI															
Behandlung	Zeit	Pfirrmann Grad		Struktur		Abgrenzbarkeit Nucleus/Anulus		Signalintensität		Bandscheibenhöhe relativ		Bandscheibenhöhe absolut (mm)		Winkel Endplatten (°)	
		Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Intakt	7 Wochen	2.67	0.52	2.50	0.55	3.00	0.63	3.00	0.63	2.00	0.00	4.30	0.63	8.60	4.18
Intakt	11 Wochen	2.80	0.84	2.80	0.84	2.40	1.14	3.20	1.10	2.00	0.00	4.39	0.44	5.60	2.62
Intakt	15 Wochen	3.20	0.45	2.80	0.45	2.20	0.45	3.80	0.45	2.20	0.45	4.21	0.63	7.74	2.53
Geschädigt	7 Wochen	2.50	0.55	2.33	0.52	2.67	0.52	2.67	0.82	2.00	0.00	4.29	0.45	7.75	3.30
Geschädigt	11 Wochen	3.00	0.71	3.00	0.71	2.60	1.14	3.40	0.55	2.40	0.89	4.33	0.67	5.81	2.27
Geschädigt	15 Wochen	3.00	0.71	2.60	0.55	2.40	0.55	3.60	0.55	2.20	0.45	4.27	0.42	7.73	3.19
Albugel	7 Wochen	2.50	0.55	2.33	0.52	2.67	0.52	2.67	0.82	2.00	0.00	4.36	0.37	7.46	2.62
Albugel	11 Wochen	3.20	0.45	3.00	0.71	2.80	0.84	3.60	0.55	2.40	0.89	4.31	0.36	6.63	2.47
Albugel	15 Wochen	3.00	0.71	2.60	0.89	2.60	0.55	3.40	0.55	2.20	0.45	4.29	0.61	7.10	2.70
Albugel plus Zellen	7 Wochen	3.00	0.71	3.00	0.71	3.00	0.71	3.00	0.71	2.00	0.00	4.31	0.28	7.87	3.12
Albugel plus Zellen	11 Wochen	3.40	0.55	3.20	0.84	3.00	0.71	3.80	0.84	2.40	0.55	4.61	0.44	5.68	2.47
Albugel plus Zellen	15 Wochen	2.80	0.84	2.40	0.55	2.20	0.45	3.40	0.55	2.00	0.00	3.95	0.64	6.25	1.94

Tabelle 11: Ergebnisse der MRI-Untersuchung der Bandscheiben

Histologie															
Behandlung	Zeit	HE				PR				AB-PAS					
		Zelldichte im Nucleus		Clusterdichte im Nucleus		Anzahl Zellen pro Cluster		Granuläre Veränderungen Vorkommen		Granuläre Veränderungen Flächenanteil		saure GAG in Nucleus und innerem Anulus		neutrale GAG in Nucleus und innerem Anulus	
		Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Intakt	7 Wochen	4.60	0.55	3.00	0.71	1.60	0.89	2.60	0.55	1.43	0.28	2.58	0.49	1.00	0.20
Intakt	11 Wochen	4.17	0.75	2.83	1.17	1.80	0.84	2.67	0.52	1.61	0.54	2.67	0.41	0.83	0.20
Intakt	15 Wochen	3.83	0.98	2.83	1.17	1.80	0.84	2.67	0.52	1.94	0.66	2.33	0.41	1.50	0.20
Geschädigt	7 Wochen	4.00	1.23	2.60	0.55	1.40	0.55	2.50	0.55	1.42	0.39	2.50	0.35	1.40	0.22
Geschädigt	11 Wochen	3.67	0.82	2.50	0.84	1.00	0.00	3.00	0.00	1.50	0.51	2.67	0.26	1.33	0.20
Geschädigt	15 Wochen	3.60	1.52	2.80	0.84	1.20	0.45	2.50	0.55	1.78	0.49	2.50	0.32	1.33	0.20
Albugel	7 Wochen	3.83	0.98	3.17	0.75	1.83	0.75	2.50	0.55	1.17	0.26	2.42	0.38	1.58	0.20
Albugel	11 Wochen	4.50	0.58	3.25	0.50	1.50	0.58	2.60	0.55	2.10	0.32	2.90	0.22	0.80	0.22
Albugel	15 Wochen	2.83	0.98	2.50	1.23	1.60	0.89	2.50	0.55	2.03	0.61	2.67	0.41	1.08	0.20
Albugel plus Zellen	7 Wochen	4.50	0.55	2.67	0.82	1.33	0.52	2.67	0.52	1.58	0.25	2.42	0.66	0.92	0.20
Albugel plus Zellen	11 Wochen	4.00	1.10	3.00	0.89	1.33	0.52	2.67	0.52	1.83	0.55	2.50	1.00	1.00	0.20
Albugel plus Zellen	15 Wochen	3.80	0.84	2.40	1.34	2.67	0.58	2.83	0.41	1.67	0.70	2.42	0.38	1.42	0.20

Tabelle 12: Ergebnisse histologischen Auswertung: HE-, PR- und AB-PAS-Färbung



		Immunhistochemie									
		Kollagen I				Kollagen II				Aggrecan	
		Kollagen I im Nucleus Score		Kollagen I im Nucleus Flächenanteil		Kollagen I im Nucleus Farbintensität		Kollagen II in Nucleus und innerem Anulus		Aggrecan in Nucleus und innerem Anulus	
Behandlung	Zeit	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Intakt	7 Wochen	0.60	1.34	0.40	0.89	0.20	0.45	4.30	1.20	4.10	0.65
Intakt	11 Wochen	0.67	1.63	0.50	1.23	0.17	0.41	4.92	0.86	5.17	0.63
Intakt	15 Wochen	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.58	0.38	4.33	0.93
Geschädigt	7 Wochen	2.33	1.86	1.33	1.37	1.00	0.89	4.33	0.82	4.17	0.82
Geschädigt	11 Wochen	1.33	1.03	0.67	0.52	0.67	0.52	4.42	0.74	4.79	0.90
Geschädigt	15 Wochen	0.67	1.63	0.17	0.41	0.50	1.23	3.92	1.36	4.25	0.88
Albugel	7 Wochen	1.50	1.76	0.83	1.17	0.67	0.82	4.33	0.68	4.33	1.21
Albugel	11 Wochen	2.00	1.87	1.20	1.30	0.80	0.84	4.90	0.22	4.80	0.97
Albugel	15 Wochen	1.33	2.42	0.67	1.21	0.67	1.21	4.67	0.61	3.92	0.38
Albugel plus Zellen	7 Wochen	0.67	1.63	0.17	0.41	0.50	1.23	4.33	0.98	3.75	1.03
Albugel plus Zellen	11 Wochen	1.50	1.76	0.67	0.82	0.83	1.17	4.92	0.74	5.08	0.66
Albugel plus Zellen	15 Wochen	1.50	1.76	1.00	1.27	0.50	0.55	4.42	0.74	4.08	0.38

**Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung: Kollagen I-, Kollagen II- und Aggrecan-Färbung**

		Biochemische Untersuchungen					
		DNA (µg/mg ww)		Kollagen (mg/100mg ww)		Proteoglykan (µg/mg ww)	
Behandlung	Zeit	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Intakt	7 Wochen	0.056	0.023	22.850	8.466	83.651	49.075
Intakt	11 Wochen	0.074	0.016	36.843	10.319	99.298	44.180
Intakt	15 Wochen	0.073	0.020	39.994	8.912	96.887	33.188
Geschädigt	7 Wochen	0.059	0.033	21.430	6.445	88.856	45.325
Geschädigt	11 Wochen	0.084	0.042	30.301	18.391	97.227	46.172
Geschädigt	15 Wochen	0.110	0.022	48.958	7.669	117.179	20.349
Albugel	7 Wochen	0.072	0.027	29.283	11.195	97.281	33.899
Albugel	11 Wochen	0.103	0.089	29.206	7.533	81.880	41.000
Albugel	15 Wochen	0.096	0.028	37.485	6.835	102.349	43.221
Albugel und Zellen	7 Wochen	0.063	0.025	25.098	8.213	81.382	31.333
Albugel und Zellen	11 Wochen	0.079	0.028	29.102	17.596	73.961	20.090
Albugel und Zellen	15 Wochen	0.080	0.038	40.062	9.100	98.482	51.981

**Tabelle 14: Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen: DNA-, Kollagen- und Proteoglykangehalt der Bandscheiben**

		Genexpressionsanalysen (Relative Expression)							
		Kollagen I A2		Kollagen II A1		Kollagen X		Aggrecan	
Behandlung	Zeit	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Intakt	7 Wochen	0.114	0.055	13.57	9.42	0.127	0.098	1.304	0.892
Intakt	11 Wochen	0.043	0.032	9.44	6.46	0.081	0.079	0.586	0.479
Intakt	15 Wochen	0.047	0.059	6.47	7.88	0.097	0.137	0.682	0.805
Geschädigt	7 Wochen	0.037	0.028	19.54	32.31	0.030	0.030	0.932	0.872
Geschädigt	11 Wochen	0.231	0.382	10.55	11.51	0.094	0.090	0.609	0.923
Geschädigt	15 Wochen	0.199	0.242	7.54	5.30	0.074	0.119	0.507	0.298
Albugel	7 Wochen	0.208	0.260	9.21	8.33	0.066	0.090	0.858	0.674
Albugel	11 Wochen	0.442	0.502	21.27	15.19	0.095	0.130	0.805	0.592
Albugel	15 Wochen	0.106	0.199	6.29	8.07	0.093	0.095	0.430	0.317
Albugel plus Zellen	7 Wochen	0.187	0.139	8.23	9.31	0.090	0.139	0.711	0.587
Albugel plus Zellen	11 Wochen	0.176	0.280	15.84	12.13	0.056	0.036	0.694	0.645
Albugel plus Zellen	15 Wochen	0.042	0.044	3.24	3.47	0.134	0.136	0.270	0.389

**Tabelle 15: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse: Relative Expression der mRNA von Kollagen I A2, Kollagen II A1 und Aggrecan**

Genexpressionsanalysen (Relative Expression)											
Behandlung	Zeit	Hyaluronansynthase 2		Hyaluronansynthase 3		Alkalische Phosphatase		Lubricin		Interleukin-1	
		Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
Intakt	7 Wochen	0.1256	0.0849	0.0742	0.0559	0.000264	0.000169	0.9049	0.9802	0.0555	0.0411
Intakt	11 Wochen	0.1345	0.1187	0.0684	0.0607	0.000216	0.000178	0.3713	0.3364	0.0491	0.0362
Intakt	15 Wochen	0.2025	0.2060	0.0763	0.1079	0.000644	0.000873	0.3955	0.3129	0.0646	0.0786
Geschädigt	7 Wochen	0.0373	0.0331	0.0236	0.0200	0.000180	0.000135	0.7796	0.7806	0.0216	0.0177
Geschädigt	11 Wochen	0.1976	0.2014	0.0796	0.0783	0.000176	0.000256	0.4025	0.2986	0.0685	0.0787
Geschädigt	15 Wochen	0.3496	0.4824	0.0487	0.0529	0.002435	0.004120	0.4617	0.2356	0.1183	0.1961
Albugel	7 Wochen	0.0585	0.0524	0.0461	0.0563	0.000198	0.000169	0.8462	0.7721	0.0339	0.0304
Albugel	11 Wochen	0.0988	0.1608	0.0568	0.0903	0.000727	0.000704	0.9926	1.2689	0.0413	0.0685
Albugel	15 Wochen	1.0181	1.7062	0.3100	0.3270	0.006263	0.014569	0.7032	0.5503	0.2248	0.2587
Albugel plus Zellen	7 Wochen	0.1033	0.1371	0.0618	0.0795	0.000087	0.000113	0.5419	0.2897	0.0464	0.0596
Albugel plus Zellen	11 Wochen	0.1627	0.1765	0.0682	0.0567	0.000241	0.000167	0.5537	0.4659	0.0521	0.0533
Albugel plus Zellen	15 Wochen	0.4114	0.2434	0.1447	0.1151	0.000714	0.001248	0.4071	0.3654	0.1865	0.1611

**Tabelle 16:** Ergebnisse der Genexpressionsanalyse: Relative Expression der mRNA von Hyaluronansynthase Isoenzyme 2 und 3, Alkalische Phosphatase, Lubricin und Interleukin-1

### 8.3 Abbildungen



Abbildung 1: Doppelkammerspritze mit Mischauksatz zur Applikation der beiden Hydrogelkomponenten, Entwicklung des Projektpartners

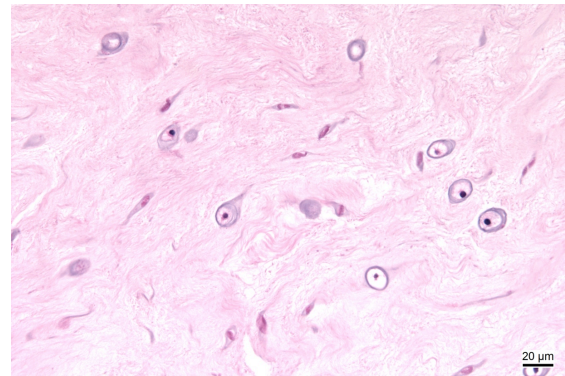


Abbildung 2: 13.10 L1/2, HE, Zelldichte Score 5, keine Cluster

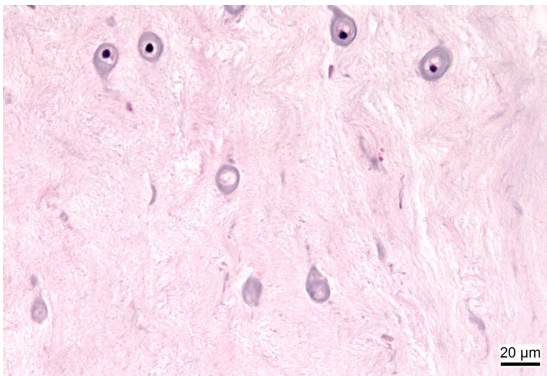


Abbildung 3: 13.10 L3/4 HE, Zelldichte Score 3, keine Cluster

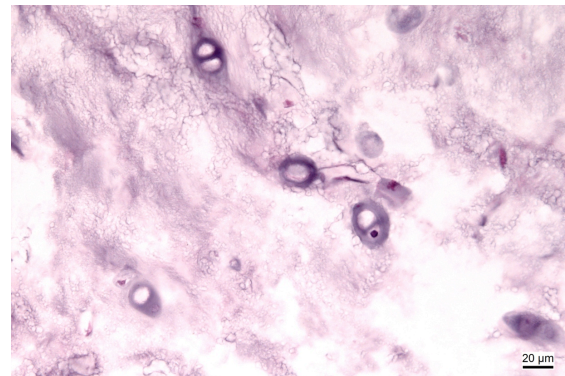


Abbildung 4: 13.11 L2/3 HE, Zelldichte Score 2, Cluster mit 2-3 Zellen

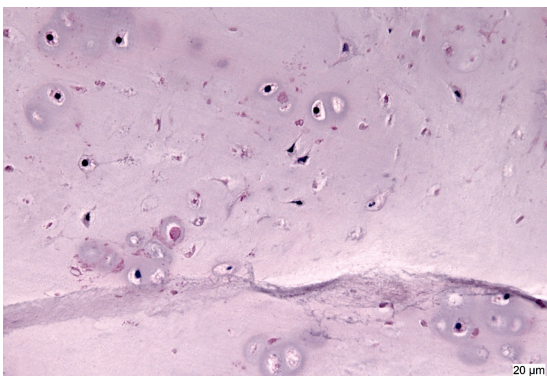


Abbildung 5: 13.09 L3/4 HE, Cluster mit 4-6 Zellen

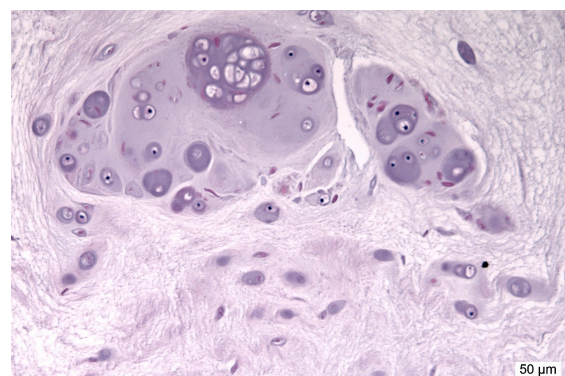


Abbildung 6: 13.04 L1/2 HE, Cluster mit mehr als 7 Zellen

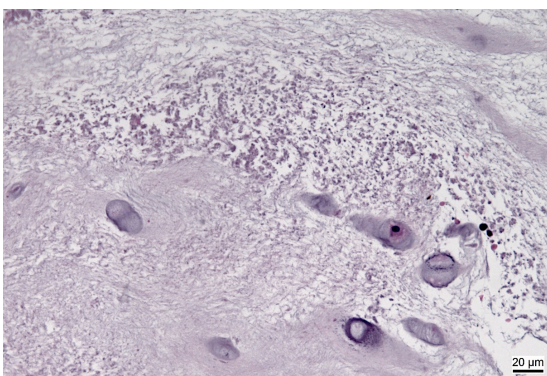


Abbildung 7: 13.15 L3/4 HE, Granuläre Veränderungen im Nucleus

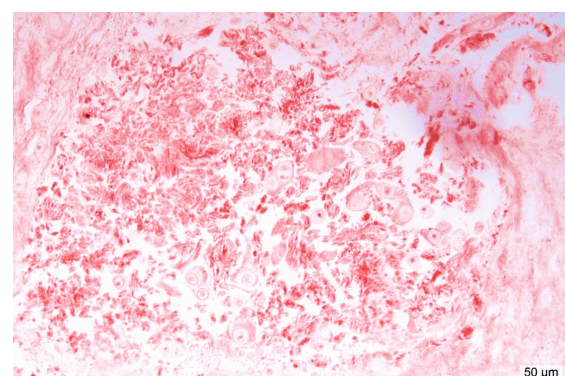


Abbildung 8: 13.12 L1/2 PR, Granuläre Veränderungen im Nucleus



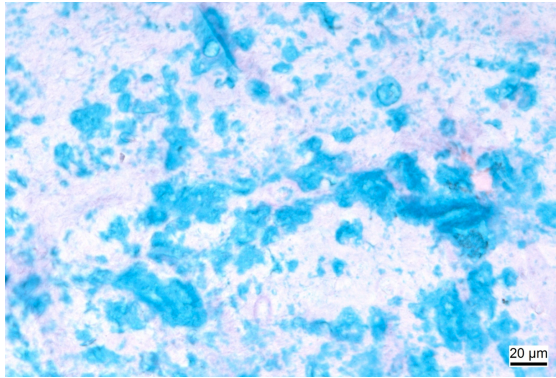


Abbildung 9: 13.15 L3/4 AB-PAS,  
Flächenanteile Blau Score 2, Purpur Score 2

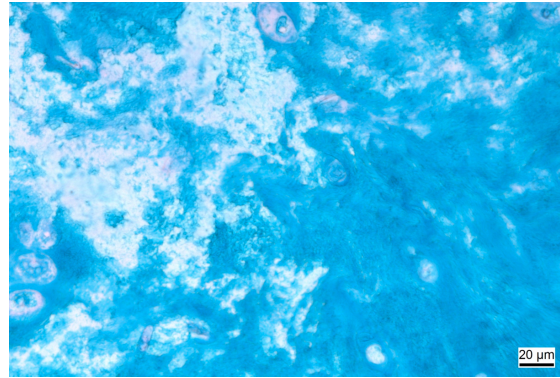


Abbildung 10: 13.04 L1/2 AB-PAS  
Flächenanteile Blau Score 3, Purpur Score 2

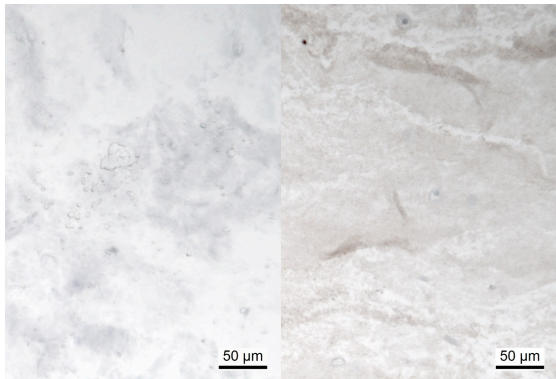


Abbildung 11: 13.10 L2/3  
Negativkontrolle Immunhistochemie

Abbildung 12: 13.10 L2/3 Aggrecan  
Farbintensität Score 1

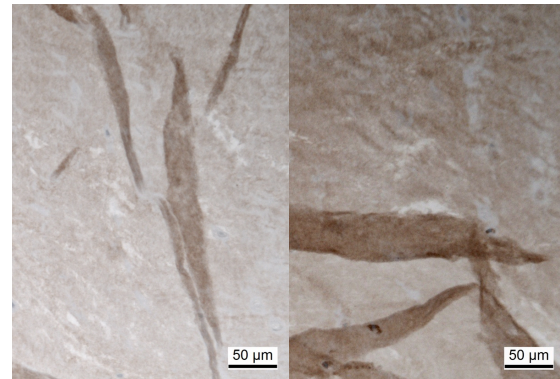


Abbildung 13: 13.13 L4/5 Aggrecan  
Farbintensität Score 2

Abbildung 14: 13.13 L1/2 Aggrecan  
Farbintensität Score 3

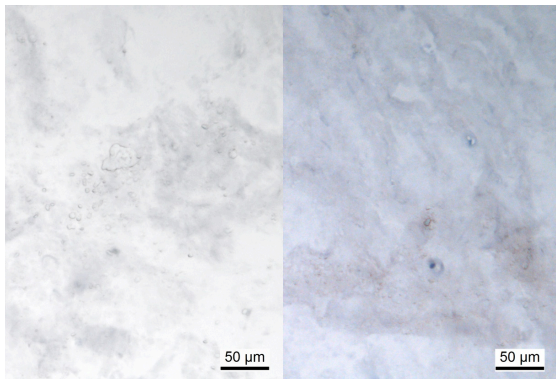


Abbildung 11: 13.10 L2/3  
Negativkontrolle Immunhistochemie

Abbildung 15: 13.05 L3/4 Kollagen I  
Farbintensität Score 1

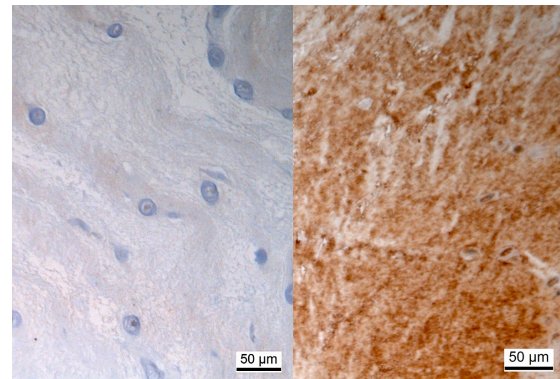


Abbildung 16: 13.20 L3/4 Kollagen I  
Farbintensität Score 2

Abbildung 17: 13.18 L4/5 Kollagen I  
Farbintensität Score 3

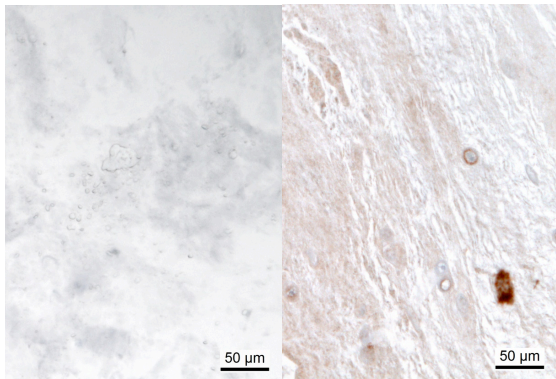


Abbildung 11: 13.10 L2/3  
Negativkontrolle Immunhistochemie

Abbildung 18: 13.04 L4/5 Kollagen II  
Farbintensität Score 1

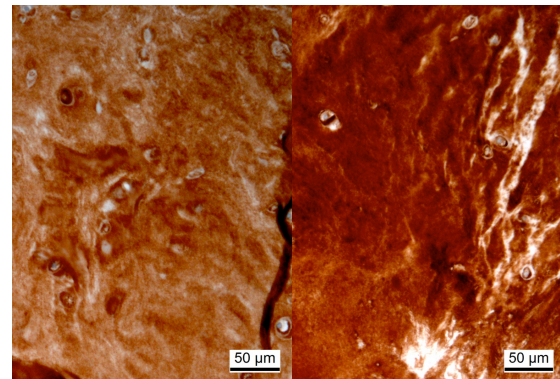


Abbildung 19: 13.11 L1/2 Kollagen II  
Farbintensität Score 2

Abbildung 20: 13.11 L4/5 Kollagen II  
Farbintensität Score 3

## 9 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei **Frau Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg** für das Überlassen des Themas sowie für die Freiheiten und das Vertrauen bei der Durchführung des Projektes bedanken.

Meinen Betreuerinnen **Dr. Katja Nuss** und **Dr. Flurina Clement** danke ich für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Für die freundliche Aufnahme im Departement für Pferde möchte ich **Prof. Dr. Anton Fürst** danken.

**Herrn Prof. Dr. Hans Geyer** danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Besonderer Dank gebührt auch **Dr. Frank Steffen, Prof. Dr. Patrick Kircher** und **Dr. Klaus Weber** für ihre Mitarbeit bei der Durchführung dieses Projekts.

**Dr. Jürgen Mollenhauer** möchte ich für die fachliche Unterstützung danken sowie ihm, **Claudia Osswald** und **Elena Boger** für den netten Empfang in Reutlingen und die Einführung in die Laboranalyse.

Bei **Ladina Ettinger-Fergusson** und **Kati Zlinsky** bedanke ich mich für ihren grossen Einsatz bei der Herstellung der Histologiepräparate und für die nette und kompetente Einführung in die histologische Technik

Danke auch an **Rainer Egle, Nicole Kramer** und **Gaby Schmid** für die Unterstützung bei Computerproblemen und administrativen Angelegenheiten.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Silvana Resegatti** und **Werner Holder** für die liebevolle Betreuung von NP, NL, NV, Tante Doro, OG, NR, DJ, XT, Lady Di, DE, Du, DH, DP, Milli, Nora Nordisch, Ute, Lily und Lana bedanken.

Zum Gelingen dieses Projekts beigetragen haben auch **Claudia Di Giovanna, René Kissling, Jasmine Nauer** und vor allem **Michi Bless**, vielen Dank dafür!

Den Teams der „**Bone and Stem Cell Research Group**“ und der „**Spine Research Group**“ vom CABMM danke ich für ihren netten Empfang im Labor und die stete Hilfsbereitschaft.

---

Ein herzliches Dankeschön geht an das gesamte **Team der MSRU**

**Mario Benn, Ramon Bucher, Dr. Flurina Clement, Anika Drechsler, Maren Estelmann, Julia Freudenhammer, Lea Gegner, Oliver Gehrig, Dr. Irem Gul Sancak, Dr. Agnieszka Karol, Käthi Kämpf, Dr. Karina Klein, Dr. Sabine Koch, Dr. Peter Kronen, Henriette Lapczynska, Dr. Silke Mark, Dr. Katja Nuss, Svende Pfundstein, Francis Pusch, Valentin Reichle, Henning Richter, Nadja Saddedine, Anke Schulze-Grotthoff, Dr. Michèle Sidler, Ansgar Solecki, Dr. Stefan Stübinger, Abigail Waddington.**

Danke **Karina**, für die unkomplizierte Hilfe bei Fragen und Problemen aller Art  
Bei **Flurina** möchte ich mich für die tolle Einführung in die Welt der Zellkultur bedanken, für ihr immer offenes Ohr und für die Wochenenden und sonstigen langen Stunden im Zellkulturlabor, die ich, dank ihrer Gesellschaft, in bester Erinnerung behalten werde.

Die Zeit bei der MSRU ganz besonders bereichert haben für mich **Julia** durch ihre Herzlichkeit und ihre Hilfsbereitschaft, **Svende** mit ihrem unverkennbaren Humor und **Lea** durch ihre Freundschaft seit dem ersten Arbeitstag. Unvergesslich bleiben die Reise nach Barcelona, die wohlverdienten Post-Partys und die gemütlichen gemeinsamen Feierabende.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich in der Hundebetreuung unterstützt haben und natürlich bei **Paco** selber für seine grenzenlose ansteckende Lebensfreude.

Ausserdem danke ich all meinen Freunden ausserhalb der MSRU, ganz besonders **Robin** für sein Verständnis und seinen Rückhalt.

Der grösste Dank gebührt meinen Eltern, meinem Vater **Peter** für die Übernahme des Lektorats und meiner Mutter **Kathrin** für all ihre fachlichen und persönlichen Ratschläge in dieser Zeit. Doch vor allem möchte ich den beiden dafür danken, dass sie mich auf meinem gesamten Lebensweg stets bedingungslos und mit viel Liebe unterstützt haben.

---

---

## Lebenslauf

<i>Name</i>	Lena Sara Müller
<i>Geburtsdatum</i>	23. Juli 1983
<i>Geburtsort</i>	Zürich
<i>Nationalität</i>	Schweiz
<i>1990 – 1996</i>	Primarschule in Zürich
<i>1996 – 2002</i>	Kantonsschule Wiedikon in Zürich
<i>2002</i>	Matura im neusprachlichen Profil
<i>2003 – 2005</i>	Studium der Geographie, Universität Zürich
<i>2005 – 2011</i>	Studium der Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
<i>16. März 2011</i>	Erhalt der Approbation
<i>2011 – 2013</i>	Mitarbeit und Anfertigung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet Brigitte von Rechenberg bei der Musculoskeletal Research Unit (MSRU) am Departement für Pferde der Vetsuisse- Fakultät Universität Zürich

---